

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von PPAR δ -Agonisten auf in-vitro kultivierte humane Darmzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Bunz

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von PPAR δ -Agonisten auf in-vitro kultivierte humane Darmzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Bunz

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Thomas Langmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christian Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung:

17.06.2010

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Aufbau und Funktion des menschlichen Darms	1
1.2	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors (PPAR)	5
1.3	Zielsetzung der Arbeit	10
2	<u>Material und Methoden</u>	11
2.1	Material	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Biologische Materialien	12
2.1.3	Synthetische Oligonukleotide	12
2.1.4	Chemikalien, Standards, Kits	12
2.2	Methoden	13
2.2.1	Zellkultur	13
2.2.2	RNA-Isolierung	15
2.2.3	Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung	16
2.2.4	Reverse Transkription	18
2.2.5	Real time PCR	19
2.2.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)	23
2.2.7	Datenauswertung	24
3	<u>Ergebnisse</u>	25
3.1	Lipidstoffwechsel	27
3.2	Zellstoffwechsel	30
3.3	Detoxifikation	35
3.4	ABC-Transporter Expressionsanalysen	36
3.5	PPAR	42
3.6	Entzündungsmediatoren	43
3.7	Weitere differentiell exprimierte Gene	47
4	<u>Diskussion</u>	48
4.1	PPAR δ Einflüsse auf den Lipidstoffwechsel	49
4.2	Zellstoffwechsel	52
4.3	Detoxifikation	58
4.4	PPAR δ Einflüsse auf ABC Transporter	59
4.5	PPAR	62

4.6	Entzündungsmediatoren	63
4.7	Weitere differentiell exprimierte Gene	64
4.8	Zusammenfassung	64
5	<u>Literaturverzeichnis</u>	66

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms

Der menschliche Darm besteht grundsätzlich aus zwei Teilen, dem Dünndarm, der in Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt ist, sowie dem Dickdarm, der aus Coecum und Colon besteht. Prinzipiell sind aber der Dünn- und Dickdarm gleichartig aufgebaut. Sie bestehen aus vier Schichten, lumenwärts befindet sich die Schleimhaut, Mukosa genannt. Darunter findet sich eine lockere Bindegewebsschicht, die Submukosa, welche die Mukosa mit der Muskularis propria, einer Muskelschicht aus längs und quer verlaufenden Fasern verbindet. Die vierte Schicht bildet schließlich die Serosa, welche im Dünndarmbereich und in Teilen des Kolons eine Duplikatur und Gefäß- und Nervenbrücken aufweist, das sogenannte Meso.

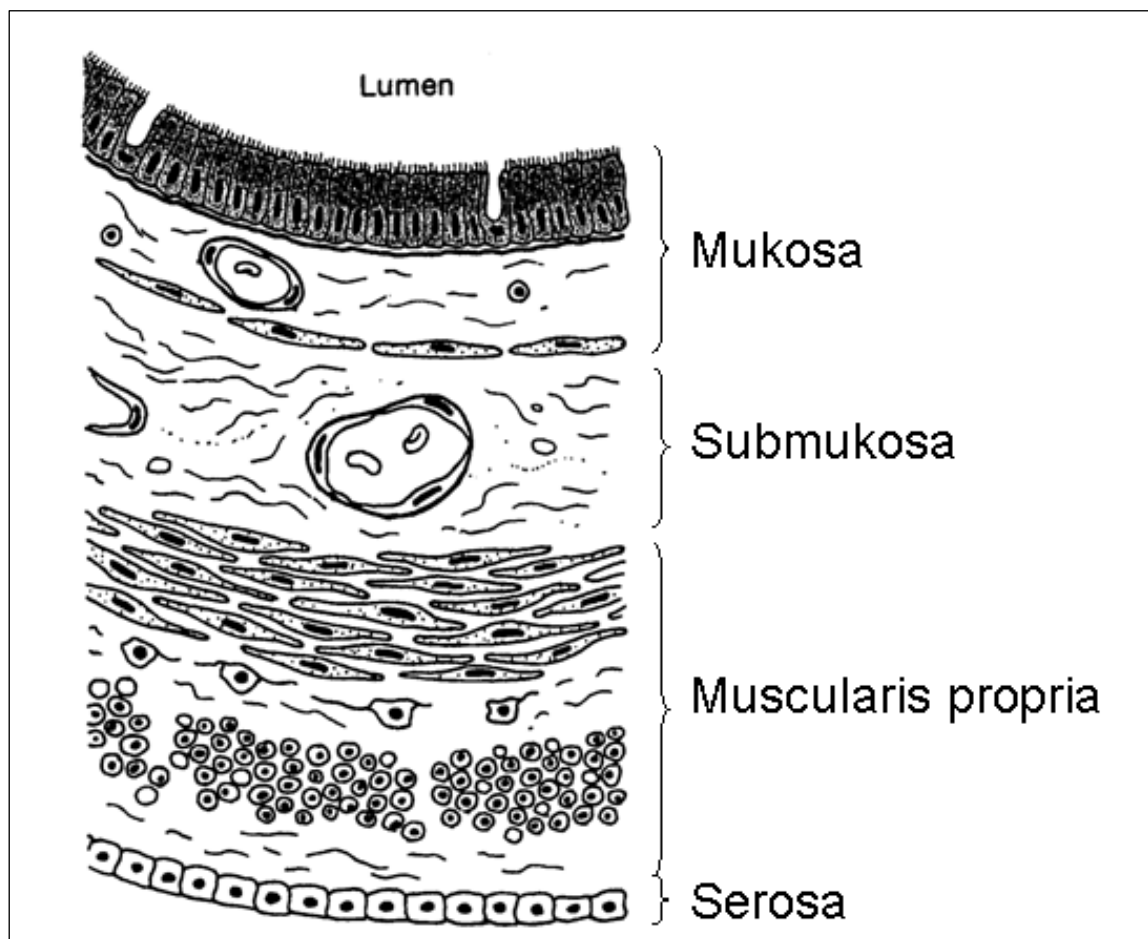


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau des menschlichen Darms**

Nach Barrett, Kim E.; Gastrointestinal Physiology, 2006

Die wichtigste Aufgabe des menschlichen Gastrointestinaltrakts besteht in der Aufnahme von Nährstoffen in den Körper. Hierbei wollen wir ein besonderes Augenmerk auf die Kohlenhydrat- und Fettabsorption legen, da diese tragende Säulen der heutzutage üblichen Ernährungsweise darstellen.

Zur Kohlenhydrataufnahme werden die durch Amylasen im Speichel und Pankreassekret verdauten Stärkespaltprodukte, so genannte Oligosaccharide, durch spezifische Hydrolasen am Bürstensaum der Enterozyten in Monosaccharide gespalten. Hierbei findet eine Umwandlung der verschiedenen Oligosaccharide in Glucose statt. Glucose wird dann durch einen sekundär-aktiven Symport mit Na^+ in die Mukosazelle aufgenommen und anschließend passiv durch den Glucose-Uniport-Carrier GLUT2 ins Pfortaderblut abgegeben.

Fette stellen einen weiteren wichtigen Teil der menschlichen Ernährung dar, bei durchschnittlicher westlicher Ernährung ca. 120-150g täglich. Sie sind definiert als organische Substanzen mit hydrophoben Eigenschaften und sind deshalb in organischen Lösungsmitteln oder Zellmembranen besser löslich als im wässrigen Milieu. Trotz dieser Löslichkeitsprobleme im Darmlumen stellt der Prozess der Lipidaufnahme ein hocheffektives System mit ausgeprägten Reservekapazitäten dar. Dies führt bei fettreicher Ernährung leicht zu einem der bekannten Probleme des metabolischen Syndroms, der Fettleibigkeit. Nahrungsfette setzen sich in der Mehrzahl aus drei langkettigen Fettsäuren (mehr als 11 Kohlenstoffatome) zusammen, die an ein Glycerinmolekül verestert sind. Zusätzlich zu diesen Nahrungsfetten werden täglich zirka 40-50g endogene Fette, vor allem über die Galle in den Gastrointestinaltrakt sezerniert. Hierunter finden sich auch ca. 1-2g Cholesterin. Diese Menge übersteigt die durchschnittliche exogene Cholesterinaufnahme um das bis zu Zehnfache.

Nahrungsfette werden durch verschiedene Mechanismen in Magen und Dünndarm in Micellen verpackt und erreichen so das Darmepithel. Wasserlösliche Bestandteile wie freie Fettsäuren erreichen das Epithel auch direkt über Diffusion.

Die Aufnahme der Mizellenbestandteile erfolgt zum einen Teil über direkte Durchschleusung durch die Zellmembran, zum anderen Teil, vor allem für langkettige Fettsäuren, auch mittels erleichtertem Transport unter Zuhilfenahme einer Transporterfamilie, den Fatty Acid Binding Proteins (FABP).

Kürzlich wurde ein spezifischer Transporter, der Niemann Pick C1 like 1 (NPC1L1) Transporter, welcher für die Cholesterinaufnahme in Enterozyten verantwortlich ist,

entdeckt. Der Wirkstoff Ezetimibe ist in der Lage, die Cholesterinaufnahme dieses Transporters signifikant zu reduzieren und wird daher zur Behandlung von Hypercholesterinämie eingesetzt.

Aufgenommenes Cholesterin wird dann in den Enterozyten entweder direkt verbraucht, in Chylomikronen eingebaut oder durch zwei ATP abhängige Transporter, den ATP-binding cassette (ABC) Transportern G5 und G8 zurück ins Darmlumen ausgeschleust.

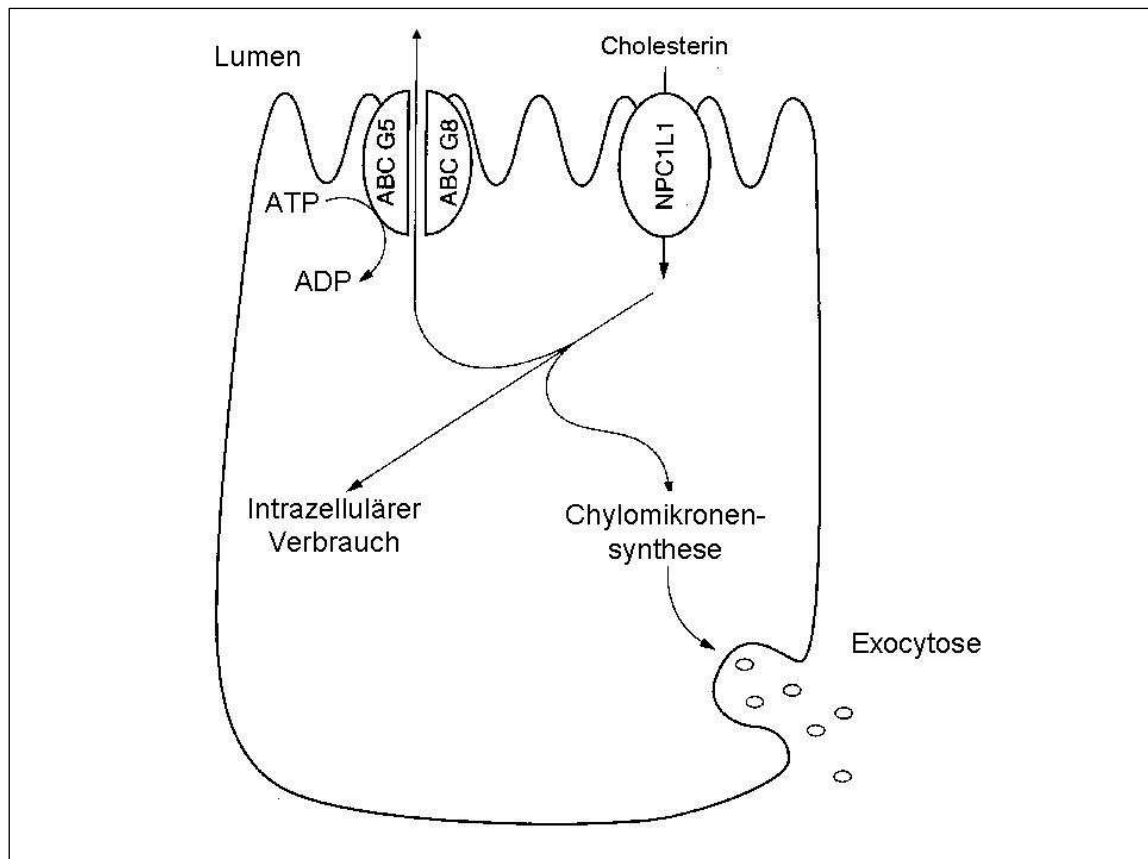


Abbildung 2: Cholesterin aus dem Darmlumen wird mittels NPC1L1 Transporter in die Enterozyten aufgenommen. Intrazellulär wird es für Stoffwechselvorgänge aufgebraucht oder in Chylomikronen verpackt exozytiert. Zusätzlich kann Cholesterin auch unter ATP Verbrauch zurück ins Lumen sezerniert werden.

Nach Barrett, Kim E.; Gastrointestinal Physiology, 2006

Zusammenfassend stellt sich die Lipidaufnahme aus dem Darmlumen als eine Kombination aus passivem Transport über die Enterozytenmembran, sowie aus erleichterten Diffusionsprozessen für einige Lipide unter Zuhilfenahme von Transportern dar. Darüber hinaus finden sich mit ABCG5 und ABCG8 Transporter, die in der Lage sind, Lipide aus dem Zytosol zurück in das Darmlumen zu schleusen und dadurch deren Aufnahme in den Körper einzuschränken. Diese Vorgänge

können einen neuen Ansatz für Therapiestrategien zur Behandlung der Hyperlipidämie und der Fettleibigkeit darstellen.

Aufgenommene Fettbestandteile werden in den Zellen wieder zusammengesetzt. Langkettige Fettsäuren und Monoglyceride werden im glatten endoplasmatischen Retikulum wieder zu Triglyceriden verestert, Cholesterin und fettlösliche Vitamine werden ebenfalls wieder verestert. Dies geschieht mit ca. 75% der aufgenommenen Fettsäuren, der Rest bleibt in den jeweiligen Enterozyten zum lokalen Verbrauch. Die wieder hergestellten Lipide werden dann von einer Proteinhülle, den Apolipoproteinen umgeben. Diese werden im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet und dann im Golgi-Apparat mit den Triglyceriden zu sogenannten Chylomikronen zusammengesetzt. Diese Chylomikronen setzen sich zusammen aus einem Kern aus Triglyceriden (ca. 80% des Gewichts), der von Phospholipiden, Cholesterolestern und Apolipoproteinen umgeben ist und werden von den Zellen auf der basolateralen Seite mittels Exocytose ausgeschleust (1).

Aufgrund ihrer Größe können Chylomikronen nicht direkt in das Kapillarsystem gelangen, sondern werden über den Umweg des Lymphsystems in die Blutbahn gebracht. Im Blut spaltet die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) freie Fettsäuren von den Triglyceriden ab, welche vor allem von Fett- und Muskelzellen aufgenommen werden. Die Chylomikronenreste werden dann in der Leber endozytiert und in Triglyceride, Cholesterin und Cholesterinester zerlegt. Diese wiederum werden von der Leber zu VLDL (Very Low Density Lipoproteins) synthetisiert und geben ihre Triglyceride als freie Fettsäuren in der Peripherie an die Organe ab. Die Reste der VLDL werden dann zur Hälfte in der Leber neu beladen und verlassen die Leber wieder als VLDL, die anderen 50% werden nach Kontakt zur hepatischen Lipase zu LDL (Low Density Lipoproteins) umgewandelt und liefern ihr Cholesterin und ihre Cholesterinester zu etwa 2/3 in der Leber und 1/3 in extrahepatischen Geweben ab.

HDL (high density lipoproteins) nehmen Cholesterin aus extrahepatischen Zellen und dem Blut auf und liefern diese an die Leber und an steroidhormonproduzierende Drüsen.

Eine durch LDL-Rezeptoren vermittelte Cholesterineinlagerung und LDL vermittelte Hemmung der 3-HMG-CoA-Reduktase (synthetisiert Cholesterin in extrahepatischen Geweben) führen zu verstärkter Cholesterineinlagerung in den peripheren Geweben. Zusätzlich sinkt durch Hemmung der 3-HMG-CoA-Reduktaseaktivität die

Konzentration von HDL im Plasma (2). Diese Kombination stellt einen erheblichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Darüber hinaus neigen Gewebe mit einem hohen Fettgehalt verstärkt zu Insulinresistenz, der Ursache für Diabetes mellitus Typ II. Eine Therapie mit PPAR δ Agonisten könnte möglicherweise diesen Effekten bereits bei der Aufnahme von Lipiden in der Darmzelle entgegenwirken und das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen senken.

1.2 Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors (PPAR)

Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors (PPAR) sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zur Superfamilie der Nukleären Hormonrezeptoren (NHR) gehören. PPAR α wurde erstmals 1990 aus Rattenleber isoliert. Wenige Zeit später konnten zwei weitere Mitglieder der Familie, PPAR γ und PPAR δ isoliert werden.

PPAR sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, dazu gehören Embryonalentwicklung, Zellproliferation, Apoptose, Immunregulation, Lipid- und Glucosestoffwechsel sowie Karzinogenese.

Sie werden durch endogene Liganden, Fettsäuren – wie Arachidon- und Linolsäure – und deren Derivate, die vorwiegend durch den Cyclooxygenase- und Lipoxigenasezyklus entstehen, sowie durch synthetische Liganden, wie Fibrate (PPAR α) und Thiazolidine (PPAR γ) aktiviert. Gleichzeitig stellen die PPAR einen intrazellulären Sensor für die Fettsäurekonzentration dar.

Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptorstruktur und zum Abspalten von Co-Repressoren, Aktivierung von Co-Aktivatoren und zur Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-rezeptor (RXR). Diesem folgt wiederum eine Aktivierung von Zielgenen, den sogenannten Peroxisome Proliferator Response Elements (PPRE) (Abbildung 3).

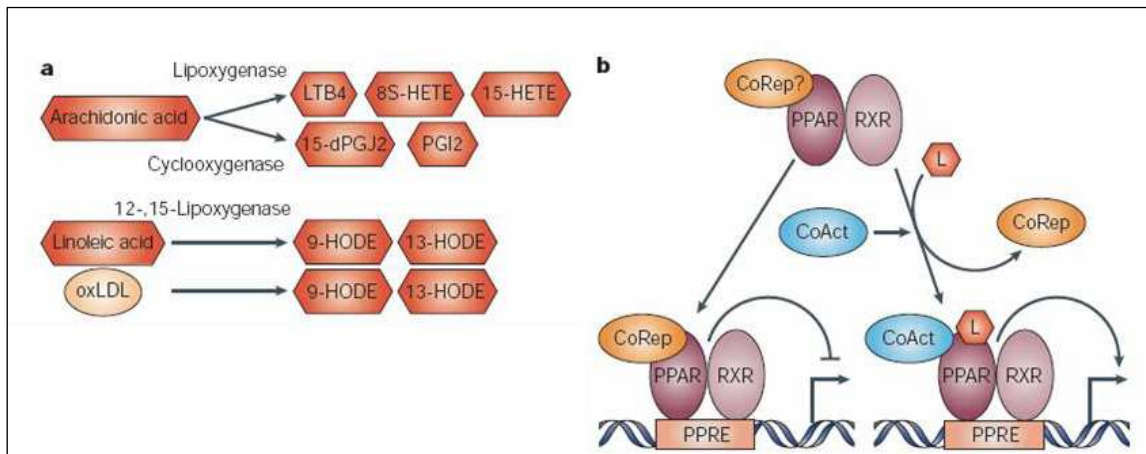


Abbildung 3: **Schemazeichnung PPAR Signalkaskaden**

a) PPAR Liganden Arachidon- und Linolsäure, sowie deren als Liganden wirksame Metabolite Leukotrien B4 (LTB4), Hydroxeicosatetrensäure (8S-HETE), vorwiegende PPAR α Agonisten, 15HETE, 15-deoxy-Prostaglandin J2 (15-dPGJ2), selektive PPAR γ Liganden und Prostaglandin I2 (PGI2, Prostacyclin) als PPAR δ Ligand. PPAR γ wird zusätzlich aktiviert durch 9-, sowie 13-Hydroxyoctaheptadiensäure (9-HODE, 13-HODE), Metabolite aus dem Lipoxygenasezyklus von Linolsäure oder von oxidiertem LDL.

b) In der Ruheform hemmen die mit einem Co-Repressor besetzten Heterodimere aus PPAR und RXR die Transkription, nach Ligandenbindung wird der Co-Repressor gegen einen Co-Aktivator getauscht, was zu einer Aktivierung der Transkription des betreffenden Gens führt. Grafik nach (3)

Neueren Erkenntnissen zu Folge haben PPAR auch die Möglichkeit, Transkription durch Bindung mit RXR und Co-Repressoren an PPRE zu unterdrücken. PPAR können außerdem direkt mit anderen Transkriptionsfaktoren Gentranskription modulieren, so zum Beispiel PPAR α und PPAR γ , welche über direkte Protein-Protein Interaktion in NF- κ B- oder AP-1 vermittelte Gentranskription eingreifen. PPAR δ bedient sich dabei eines relativ außergewöhnlichen Mechanismus der Transkriptionsunterdrückung, indem es an PPRE bindet und dadurch die von PPAR α und PPAR γ vermittelte Transkription von Zielgenen verhindert (4).

All diese Mechanismen zeigen die Komplexität der von PPAR geregelten Vorgänge.

Im Gegensatz zu PPAR δ sind die biologischen Funktionen von PPAR α und PPAR γ vergleichsweise gut erforscht. Beide spielen eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel und Energiehaushalt des Körpers.

PPAR α , therapeutisches Ziel von Fibraten, einer Gruppe von Lipidsenkern, wird hauptsächlich in Leber, Herz, Skelettmuskulatur, sowie den Endothel- und glatten

Muskelzellen der Gefäße exprimiert Es reguliert die Elimination von überschüssigen Fettsäuren durch die Aktivierung kataboler Stoffwechselvorgänge, hauptsächlich durch Stimulation hepatischer Peroxisomen und deren Fettsäureoxidasen, sowie die Bildung von Entzündungsmarkern (5). In Tierversuchen führte eine Langzeitstimulation mit PPAR α Agonisten zunächst zu Leberhypertrophie und Hyperplasie, Peroxisomen-Proliferation, Transkriptionsaktivierung und zur gesteigerten Enzymaktivität im Fettsäuremetabolismus (β -Oxidation, Fettsäuretransporter, zytoplasmatische Leber-FABP und Enzyme der CytochromP450-Familie). In mehreren Studien mit Ratten und Mäusen kam es nach dieser primären Phase jedoch zur Ausbildung von hepatozellulären Karzinomen (4).

PPAR γ hingegen ist essentiell für die Differenzierung und Proliferation sowie Lipidaufnahme und Abgabe in Adipozyten. PPAR γ ist zusätzlich ein hochaffiner Rezeptor für die Insulin-Sensitizer Thiazolidine, hierdurch kann eine direkte Verbindung zu Diabetes mellitus Typ II, sowie dem metabolischen Syndrom hergestellt werden. Klinische Studien mit Thiazolidinen zeigen, dass PPAR γ Aktivierung zu niedrigeren postprandialen, sowie Nüchtern-Glucosespiegeln und zu einer Abnahme von freien Fettsäuren führt. Zusätzlich zeigt sich, dass die Blutinsulinkonzentrationen ebenfalls sinken (6-9). Außerdem erhöhen sich die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in peripheren Geweben, sowie die Insulinempfindlichkeit der Leber (verstärkte Hemmung der Glukoneogenese) und des Fettgewebes (erniedrigte Konzentration freier Fettsäuren) (8). PPAR γ scheint auch wichtige Funktionen im Bereich der Darmzellproliferation und Differenzierung sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu haben. Der Zusammenhang zwischen PPAR γ und Tumorentstehung wurde bisher am besten an Kolonkarzinomen von Ratten untersucht, bei denen die PPAR γ Aktivität erhöht ist. Im Xenograft-Modell war der PPAR γ Agonist Troglitazone in der Lage, die Entwicklung von Tumoren, die aus Darmkrebszellen stammten, zu hemmen (10). Damit übereinstimmend ist Troglitazone in der Lage, den Schweregrad von Colitis Ulcerosa, einem Risikofaktor für die Entstehung von Kolonkarzinomen beim Menschen, abzuschwächen und die Bildung von aberranten Krypten, einem frühen Stadium der Karzinomentstehung entgegen zu wirken (11, 12).

PPAR δ ist ein nukleärer Rezeptor mit einem breiten Spektrum an physiologischen Funktionen. Es weist ein vielfältiges Expressionsmuster in adulten Säugern auf und kann im Verlauf der Embryogenese sehr früh nachgewiesen werden. Daher führt eine PPAR δ Gendeletion im frühen Embryonalstadium aufgrund von Plazentadefekten fast immer zum Absterben des Embryos. Die restlichen Embryos weisen bei Geburt einen Minderwuchs, Haut- und Myelinisierungsdefekte sowie eine verringerte Körperfettmasse auf (13). Mehrere Studien haben gezeigt, dass PPAR δ durch eine Vielzahl von Liganden aktiviert wird und in eine große Anzahl von Entwicklungs- und metabolische Regulationsvorgänge eingebunden ist. PPAR δ wird durch sowohl gesättigte als auch ungesättigte langkettige Fettsäuren, Prostacyclin, Retinolsäure und einige Eicosanoide (z.B. Prostaglandin I₂) aktiviert (14, 15). Pharmakologische Agonisten, Derivate der Phenoxyessigsäure, wie GW501516 wurden synthetisiert und aktivieren PPAR δ mit einer viel höheren Selektivität als andere PPAR Isoformen.

Eine zentrale Rolle von PPAR δ im Lipidstoffwechsel wurde durch *Oliver et al.* am Beispiel von Insulin-resistenten, adipösen Rhesusaffen nachgewiesen. Hierbei kam es unter Gabe von GW501516 über vier Wochen zu einer signifikanten Erniedrigung der VLDL-, Triglyzerid- und Insulinspiegel. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der HDL Plasmakonzentration. Zusätzlich konnte bei in-vitro Versuchen an Makrophagen eine Induktion von ABCA1 und apoA1 – abhängigen Lipideffluxmechanismen identifiziert werden (16).

Darüber hinaus spielt PPAR δ eine wichtige Rolle bei der Lipidaufnahme im Darm. In Enterozyten ist PPAR δ in die Steuerung der Lipidabsorption durch Fettsäuren involviert. Dies geschieht durch Expression von Genen wie Fatty acid binding protein (FABP1) und Fettsäure Translocase (FAT) (17). *Fredenrich et al.* konnten zusätzlich bei Überexpression von PPAR δ an transgenen Modellen eine gesteigerte Fettsäureoxidation im Skelettmuskel, sowie eine Veränderung der Fettsäureverteilung, weg vom Fettgewebe und hin zur Muskulatur nachweisen. Dies führte letztendlich zu einer signifikanten Abnahme der Fettmasse durch Fettzellhypoplasie (18).

Während an oben genannten Funktionen mittlerweile kaum mehr Zweifel herrschen, ist die Rolle von PPAR δ in Entstehung und Wachstum von Darmtumoren weiterhin sehr umstritten.

1999 wurden von *He et. al* erste Hinweise gefunden, welche einen verstärkenden Effekt von PPAR δ bei der Tumorentstehung im Darm nahe legen. Es wurde beobachtet, dass das adenomatöse Poliposis coli (APC) Tumorsuppressor-Gen in Tumorzelllinien die PPAR δ Expression negativ reguliert. Findet sich ein mutiertes APC Allel, ist die Fähigkeit des APC Proteins, die β -catenin/TCF4 Signalkaskade zu unterdrücken, herabgesetzt. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von Onkogenen (z.B. Cyclin D1, c-myc, etc.) und zu einer unkontrollierten Proliferation von Darmzellen. Daraus wurde geschlossen, dass PPAR δ durch β -catenin/TCF4 hochreguliert und dadurch die Karzinomentwicklung potenziert wurde. Darüber hinaus wurde ein Einfluss von Cyclooxygenasemetaboliten diskutiert, da bekannt ist, dass Cyclooxygenasehemmer Tumorentstehung beim Menschen verhindern können. Daraus wurde geschlossen, dass diese Metabolite als PPAR δ Liganden Zellproliferation stimulieren und dadurch das Tumorwachstum fördern können (19).

Nachfolgende Studien unterstützen diese Theorie, insofern sich bei Tumorzelllinien mit fehlender PPAR δ Expression ein verlangsamtes Wachstum feststellen lässt (20), eine erhöhte Expression von PPAR δ in Darmkrebszellen des Menschen und im Tiermodell mit einer erhöhten COX-2 Expression einhergeht (21) und die Behandlung von APC-Knockout-Mäusen mit dem PPAR δ Liganden GW501516 zu verstärkter Tumorgenese im Dünndarm und zu einer Unterdrückung der Apoptose von Kolonkarzinomzellen führt (22).

Andere Studien hingegen legen nahe, dass PPAR δ Aktivierung, die Tumorentwicklung abschwächen kann. Hierbei ist unklar, ob PPAR δ wirklich durch β -catenin/TCF-4 hochreguliert wird, da eine Gendeletion auf einem APC Allel im Mäusekolon zu einer Erniedrigung von PPAR δ mRNA und Protein führte (23). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die fehlende Expression von PPAR δ nicht das Auftreten von Kolonpolypen und Tumoren in Mäusen verhindern kann, sondern sowohl bei genetisch (APC^{min} Mäusen) und chemisch induzierten Tiermodellen eine Exazerbation der Tumorentstehung zu beobachten war (24).

Generell lässt sich aufgrund des ubiquitären Auftretens von PPAR δ und der Tatsache, dass bisher noch kein ausschließlich durch PPAR δ reguliertes Zielgen identifiziert wurde, eine eher modulierende Funktion für PPAR δ ableiten.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Eine Vielzahl von Vorversuchen deutet stark darauf hin, dass PPAR δ eine modulierende Funktion im Bereich des Glucose- und Lipidstoffwechsels aufweist. Daher war es für die Arbeitsgruppe von Bedeutung, potentielle pharmakologische Vorteile von PPAR δ Agonisten im Vergleich zu den jeweiligen PPAR α und PPAR γ beeinflussenden Einzelwirkstoffen herauszustellen. Zusätzlich sollte eine potentielle Kanzerogenität des Wirkstoffs ausgeschlossen werden, ebenso mögliche proinflammatorische Komponenten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Effekte der PPAR δ Agonisten GW501516 und Aventis PPAR δ Aktivator auf bestimmte Gene in in-vitro Versuchen nachzuweisen. Hierbei wurden Auswirkungen von Rosiglitazone als bekannter PPAR γ Agonist zum Vergleich mitbestimmt.

Im ersten Schritt wurden Caco-2 Zelllinien der fünf Inkubationsbedingungen Ethanol (EtOH), Rosiglitazone, GW501516, sowie Aventis PPAR δ Aktivator und Aventis PPAR δ Antagonist mit einer jeweiligen Konzentration von 1 μ mol/l mittels Affymetrix Microarrays analysiert. Hier waren Gene mit vermuteter PPAR-Interaktion aus verschiedenen Bereichen des Lipid- und Zellstoffwechsels, der Detoxifikation, des Glukosehaushalts und so weiter Ziel der Analyse. Anschließend wurden in einem weiteren Arbeitsschritt die signifikanten, differentiell regulierten Gene mittels TaqMan Real-time PCR als unabhängiges, quantitatives Messverfahren validiert. Hierbei wurden zusätzlich die ATP-Binding-Cassette Transporter ABCA1, ABCC4, ABCG1, ABCG2, ABCG5 und ABCG8 sowie drei wichtige proinflammatorische Darmzellzytokine (TNF α , IL1 β , IL8) untersucht. Die ABC Transporter waren von besonderem Interesse, da sie eine Vielzahl von Interaktionen im Bereich des Zell- und Fettstoffwechsels, sowie im Medikamentenmetabolismus besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Real-time PCR Gerät

ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems (Foster City, USA)

Spektrophotometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

GeneQuant Pro, Biochrome (Cambridge, United Kingdom)

NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)

RNA Qualitätskontrolle

Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies (Palo Alto, USA)

Zentrifugen

Festwinkelrotorzentrifuge J2-21 M/E, Beckmann (München)

Biofuge 15R, Heraeus (Hanau)

Microcentrifuge Force7, Denver Instruments (Denver, USA)

Sonstige Geräte

Analysenwaage: LC620P, Sartorius (Göttingen)

Brutschrank: Heraeus B6120, Heraeus (Hanau)

Küvette: Ultra Microvolume Cell, Amersham Germany (Freiburg)

Vortexer: Vortex Genie 2, Bender und Hohbein (Zürich, Schweiz)

2.1.2 Biologische Materialien

Zelllinien

Caco-2: kolorektales Adenokarzinom, human, ATCC-Nr. HTB-37

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Primer und Sonden für TaqMan[®] real-time RT-PCR

Als interne Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) benutzt. Das kommerziell entwickelte Reagenz (Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control, Applied Biosystems (Foster City, USA), Prod.-Nr. 4310884E) enthält Forward- und Reverse-Primer sowie die VIC[™]/TAMRA-markierte Sonde und kann unmittelbar in die Reaktion eingesetzt werden.

Sämtliche Sonden wurden als Essay on Demand bei der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

2.1.4 Chemikalien, Standards, Kits

Stimulans

Ethanol (70%), Merck (Darmstadt)

Rosiglitazone (1mM), GlaxoSmithKline (Brentford, UK)

GW 501516 (1mM), GlaxoSmithKline (Brentford, UK)

AVE full PPAR δ Aktivator (1mM), Sanofi-aventis, vormals Aventis (Frankfurt / Main)

AVE PPAR δ Antagonist (1mM), Sanofi-aventis, vormals Aventis (Frankfurt / Main)

Kits und Enzyme

RNeasy Midi Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland), Kat.-Nr. 75144

Reverse Transcription System, Promega (Madison, USA), Kat.-Nr. A3500

TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems (Foster City, USA), Prod.-Nr. 4326708

RNase ZAP, Ambion (Austin, USA), Kat.-Nr. 9780

InstantELISA IL-1 β Kit, Bender MedSolutions (Wien, Österreich), Kat.-Nr.

BMS224INST

Instant ELISA IL-8 Kit, Bender MedSolutions (Wien, Österreich), Kat.Nr.

BMS204/2INSTCE

Instant ELISA TNF- α Kit, MedSolutions (Wien, Österreich), Kat.Nr. BMS223INSTCE

Sonstiges

Nukleasefreies Wasser: Promega (Madison, USA), Kat.-Nr. P1193

Easyflask™ Flaschen mit Filterkappe (75 cm²), Nunc (Wiesbaden), Kat.-Nr. 156499

BD Falcon™ 6-well Cell Culture Plate, BD Biosciences (San Jose, USA), Kat.-Nr. 353046

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Caco-2

Bei Caco-2 Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie, die ursprünglich 1974 aus dem primären Kolonkarzinom eines 72-jährigen Patienten kaukasischer Abstammung gewonnen wurde. Caco-2 Zellen haben den Vorteil, dass sie sich problemlos unter Standardbedingungen kultivieren lassen. Sie wachsen adhärent und bilden ein epithelartiges Monolayer aus, der in wesentlichen Charakteristika dem intestinalen Epithel des Dünndarms entspricht (25). So exprimieren ausdifferenzierte und konfluente Caco-2 Zellen, obwohl sie ursprünglich von einem Kolontumor abgeleitet wurden, ein enterozyten-typisches Proteinmuster; die im undifferenzierten Zustand noch vorhandene Expression kolonepithel-spezifischer Proteine hingegen geht verloren (26). Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Zellen auch in Morphologie, Polarität, bei Transportvorgängen und im Xenobiotikametabolismus (27) Dünndarmepithelzellen sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund werden sie bevorzugt

zur Untersuchung von Diffusions- und Transportvorgängen in der pharmazeutischen Forschung, aber auch als Zellkulturmodell zur Klärung der Rolle des Epithels bei CED eingesetzt.

Zellkulturprotokoll: Zellen splitten

- Kulturbedingungen im Brutschrank: 37°C, Wasserdampf gesättigt, 5% CO₂ Atmosphäre
- Medium: 10ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Dulbecco's minimal essential medium) mit 10% hitzeinaktiviertem FKS (Fetales Kälberserum) in 75cm² Zellkulturflasche
- Zellen 3-5 Tage kultivieren, bis sie eine konfluente Schicht (Monolayer) bilden
- Medium absaugen
- Zellen mit 10ml PBS (Phosphate Buffered Saline) waschen, PBS absaugen
- 5ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA) dazugeben und für 5-10min bei 37°C inkubieren, damit sich die adhärenenten Zellen ablösen (ggf. nicht abgelöste Zellen durch vorsichtiges Klopfen abschlagen)
- Zellen in 10ml Kulturmedium resuspendieren und in 50ml Falcon-Tube überführen
- zentrifugieren (10min, 21°C, 1000-1200rpm), Überstand absaugen
- Zellpellet in 30ml Kulturmedium resuspendieren, in drei neue Kulturflaschen aussäen (1:3 Splitten)

Zellkulturprotokoll: Zellen ernten

- Zellen wie oben bis zur Konfluenz kultivieren
- Medium abkippen
- Zellen zweimal mit je 10ml PBS waschen
- PBS möglichst vollständig durch Absaugen entfernen
- 1ml Trypsin pro Zellkulturflasche zugeben, schwenken
- Zellen mit Zellschaber ablösen und in 15ml Falcon-Tube überführen
- bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahren

2.2.2 RNA Isolierung

RNeasy Protect Midi Kit

RNA Isolation aus der Caco-2 Zelllinie durch RNeasy Midi Kit (Qiagen). Hierbei wird das Zelllysate über ein Säulchen zentrifugiert, das eine Membran auf Siliziumgelbasis enthält. Diese Membran ist in der Lage RNA zu adsorbieren. In weiteren Waschschritten werden Verunreinigungen entfernt und die RNA schließlich mit RNase- freiem Wasser eluiert.

Extraktionsprotokoll

Im Kit enthaltene Reagenzien

- RNAlater™ RNA Stabilisierungsreagenz
- RNeasy Midi Zentrifugensäulchen
- Sammelröhrchen 15ml
- Puffer RLT (Lysispuffer)
- Puffer RW1 (Waschpuffer)
- Puffer RPE (Waschpuffer)
- RNase freies Wasser

Zusätzlich benötigte Reagenzien

- β -Mercaptoethanol
- Ethanol

Aufschluss und Homogenisierung des Materials

- β -Mercaptoethanol mit RLT-Puffer mischen (10 μ l auf 1ml Puffer)
- Zelllysate in 15ml Sammelröhrchen mit 4ml RLT/ β -ME mischen

RNA Isolierung

- 5:1 Mischung aus 100% Ethanol und RPE-Puffer herstellen
- 4ml RPE/EtOH zum Überstand geben und schütteln
- Mischung auf RNeasy Midi Säulchen (in 15ml Sammelröhrchen) geben, zentrifugieren (5min, 4000g, 22°C), Durchfluss verworfen
- 4ml RW1-Puffer auf Säulchen geben, zentrifugieren (5min, 4000g, 22°C), Durchfluss verworfen

- 2,5ml RPE/EtOH auf Säulchen geben, zentrifugieren (2min, 4000g, 22°C), Durchfluss verwerfen
- 2,5ml RPE/EtOH auf Säulchen geben, zentrifugieren (5min, 4000g, 22°C), Säulchen auf neues Sammelröhrchen stecken
- 150µl RNase freies Wasser auf Säulchen geben, 1min bei RT stehen lassen, zentrifugieren (3min, 4000g, 22°C)
- letzten Schritt wiederholen
- Durchfluss in Eppendorfcup überführen
- nach Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C einfrieren

2.2.3 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Qualitätskontrolle mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

Die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von Verunreinigungen oder degradierter RNA ist die Auftrennung auf einem denaturierenden Agarosegel und die nachfolgende Visualisierung mit Ethidiumbromid (EtBr). EtBr ist ein Interkalationsfarbstoff, der mit DNA Komplexe bildet, die bei UV-Bestrahlung (366nm) orangerot fluoreszieren. Nachteile dabei sind jedoch die relativ großen Mengen an RNA, die dafür benötigt werden und die Giftigkeit bzw. Mutagenität des EtBr. Eine alternative Möglichkeit zur Qualitäts- und Quantitätsbestimmung beruht auf der Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers zusammen mit dem RNA 6000 LabChip. Dieses Lab-On-Chip Verfahren erfolgt nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und der Detektion durch den in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen. Dazu wird der Chip mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-Gemisch geladen, die RNA-Proben (1µl) und ein Größenstandard (Leiter) werden in die entsprechenden Vertiefungen (Wells) auf dem Chip pipettiert und durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Dies geschieht in einem Separationskanal, in den die Proben nacheinander durch Mikrokapillaren gelangen. Die Ergebnisse werden aufgezeichnet und können mit Hilfe der Agilent 2100 BioAnalyzer Software analysiert werden.

UV-Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung mittels GeneQuant Pro

Die Spektrophotometrie ist eine zuverlässige und genaue Methode, um die Konzentration von RNA zu bestimmen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die möglichst beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Durchgang durch wässrige Lösungen abgeschwächt wird. Diese Extinktion ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz, ihrem spezifischen Extinktionskoeffizienten und der durchstrahlten Flüssigkeitsschichtdicke. Dieser Zusammenhang wird durch folgende Gleichung beschrieben,

$$E = \epsilon \times c \times D \text{ (Lambert-Beersches Gesetz)}$$

wobei gilt: E: Extinktion, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient, c: Konzentration der absorbierenden Teilchen, D: durchstrahlte Flüssigkeitsschichtdicke. Aus dieser Beziehung kann man bei konstanter Schichtdicke (festgelegt durch die verwendete Küvette) und bekanntem Extinktionskoeffizienten (abhängig von der verwendeten Wellenlänge und den Eigenschaften der absorbierenden Teilchen) durch Bestimmung der Extinktion die Konzentration berechnen. Für die Messung wurden zuerst 1:50 Verdünnungen der RNA Proben mit RNase freiem Wasser hergestellt; für den Leerwert wurde ebenfalls RNase freies Wasser verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der Proben auf dem GenQuant Pro Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm, was dem Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen der RNA entspricht, gemessen. Zusätzlich wurde, um Proteinverunreinigungen auszuschließen, die Extinktion bei 280nm bestimmt und der Quotient E_{260}/E_{280} gebildet, der bei optimaler Präparation 2,0 beträgt und mindestens >1,8 sein sollte.

Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop®

Die NanoDrop Technologie arbeitet ebenfalls auf spektrophotometrischer Basis und stellt eine Weiterführung dieser Technik dar. Hierbei wird im Vergleich zur herkömmlichen spektrophotometrischen Methode eine wesentlich geringere RNA Menge (1µl) zur Konzentrationsbestimmung benötigt. Darüber hinaus müssen die

Proben nicht verdünnt werden und können direkt auf die Messeinheit gegeben werden.

2.2.4 Reverse Transkription

Das in der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) eingesetzte Enzym Taq-DNA-Polymerase (s.u.) benötigt als Matrize (Template) DNA. Aus diesem Grund muss man die isolierte mRNA zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umschreiben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Reverse Transkription (RT). Diese Aufgabe übernehmen RNA-abhängige DNA Polymerasen, die sog. Reversen Transkriptasen. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die aus Retroviren stammen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet. Dieser RT-Kit enthält die AMV-Reverse Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus, einem Geflügelvirus. Außerdem kann man wahlweise Oligo(dT)₁₅-Primer oder Random Hexamer Primer in die Reaktion einsetzen. Während man mit ersteren relativ spezifisch mRNA amplifizieren kann, da sie an die 3'-Poly(A)-Region der mRNA binden, vermehrt man mit Random Hexamer Primern unspezifisch jede RNA, also z.B. auch ribosomale RNA.

Durchführung

• Reaktionsansatz	Volumen
MgCl ₂ , 25mM	8µl
dNTP Mix, 10mM	4µl
10fach Reverse Transcription Puffer (Tris-HCl, 10mM, KCl, 50mM, Triton® X-100, 0,1%)	4µl
Rekombinanter RNasin® Ribonuklease Inhibitor	1µl
AMV Reverse Transkriptase, 30u	1µl
Oligo(dT) ₁₅ -Primer, 1µg	2µl
Total RNA, entsprechend 2µg	xµl
Nuklease-freies Wasser, auffüllen auf Gesamtvolumen von	40µl

- Ansatz in sterilem Eppendorfcup für 60min bei 42°C inkubieren
- anschließend 5min auf 95°C erhitzen (inaktiviert E nzym)
- für 5min auf Eis abkühlen
- fertige cDNA bis zur weiteren Verwendung auf -20°C lagern

2.2.5 Real-time PCR

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde Anfang der 80er Jahre von Karry B. Mullis entwickelt (28), der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Sie bietet die Möglichkeit DNA zu vervielfältigen, ohne dass dafür lebende Organismen wie Bakterien benötigt werden.

Bei der Kettenreaktion wird ein bestimmter DNA-Abschnitt in vitro durch eine thermostabile DNA-Polymerase, die sog. TaqPolymerase amplifiziert. Sie stammt aus dem natürlicherweise in heißen Quellen vorkommenden thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Eine typische PCR setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: 1. Schmelzen (Melting). Hierbei wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt (Abb. 4 a). 2. Anlagerung (Annealing). Bei diesem Schritt lagern sich bei einer Temperatur von 65-80°C kurze (<50 Basen), synthetische Oligonukleotide (Primer) den Einzelsträngen an; die entstehenden partiellen Doppelstränge dienen der Taq-Polymerase als Startpunkt (Abb. 4 b) 3. Verlängerung (Elongation). Die DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang (Abb. 4 c). Diese Schritte werden in mehreren Durchläufen wiederholt. Dabei findet bei jedem Zyklus eine Verdoppelung der DNA statt, d.h. die Zielsequenz wird exponentiell vermehrt.

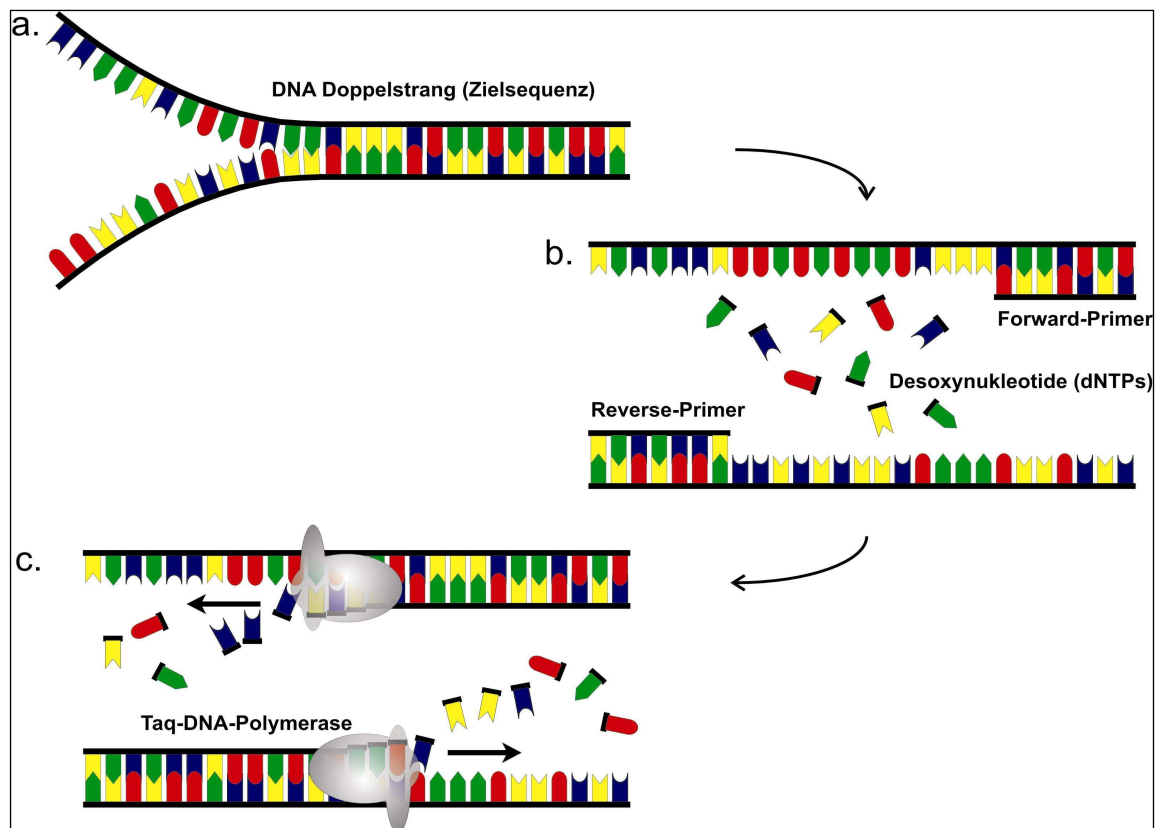


Abbildung 4: **Polymerasekettenreaktion**

Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Einzelheiten siehe Text.

TaqMan

Die TaqMan Technologie ist eine Real-time PCR Methode, einer Weiterführung der PCR Methode. Hierbei erfolgt die Markierung des PCR-Produkts durch ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, das spezifisch an die entsprechend komplementäre Zielsequenz bindet. An diese Gensonde ist neben dem Reporterfarbstoff zusätzlich ein "fluoreszenzauslöschender" Farbstoff (Quencher) gebunden. Solange die Sonde intakt ist, wird die Energie von dem angeregten Fluorophor (Reporter) zu dem benachbarten Chromophor (Quencher) transferiert, ohne dass dabei Strahlung abgegeben wird (sog. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer FRET (29)). Während der PCR bindet die Sonde zwischen Forward- und Reverseprimer und wird bei Synthese des Komplementärstranges durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Ampli Taq Gold DNA Polymerase abgebaut. Die dadurch bedingte räumliche Trennung von Reporter und Quencher führt dazu, dass das Fluoreszenzsignal abgestrahlt und dadurch detektiert werden kann. Da die

Ampli Taq Gold Polymerase für ihre Exonukleaseaktivität doppelsträngige DNA benötigt, bleiben ungebundene Sonden intakt (Abbildung 5).

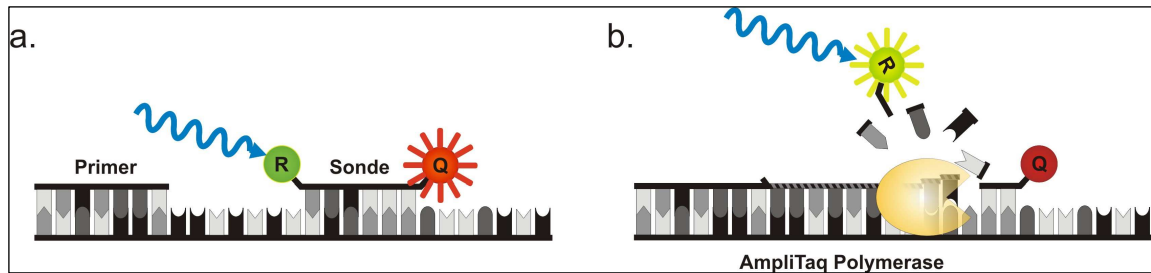


Abbildung 5: **Prinzip des TaqMan Fluoreszenzsonden Assays**

In der Anlagerungsphase der PCR binden Primer und ein weiteres an beiden Enden fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (Sonde) an die einzelsträngige DNA. Solange die Sonde intakt ist (a.) wird bei Anregung durch Licht die Energie mittels FRET vom Reporter- (R) auf den Quencherfarbstoff (Q) übertragen. In der Elongationsphase der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq Gold DNA Polymerase abgebaut (b.). Regt man jetzt an, findet durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher kein Energietransfer mehr statt, die Energie wird als detektierbares Fluoreszenzsignal vom Reporter abgestrahlt.

Die TaqMan PCR wurden auf dem ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Reaktionen wurde der TaqMan Universal PCR Master Mix verwendet (Applied Biosystems). Er enthält neben der oben erwähnten AmpliTaq Gold DNA Polymerase für die TaqMan PCR optimierte Pufferkomponenten, einen Farbstoff, der als passive Referenz zur Berechnung der Fluoreszenz dient, einen dNTP Mix mit dUTP statt dTTP und als weiteres Enzym eine Uracil-N-Glycosylase (AmpErase UNG). Dieses Enzym kann DNA-Stränge abbauen, die statt Thymin Uracil enthalten. Diese können z.B. aus vorhergehenden PCR stammen, in denen dTTP durch dUTP ersetzt worden war. Damit verhindert die AmpErase UNG eine Reamplifizierung von kontaminierenden PCR Produkten.

Durchführung

- Reaktionsansatz

Volumen

TaqMan Universal PCR Master Mix	10µl
Forward Primer (18µM)	1µl
Reverse Primer (18µM)	1µl
Sonde (5µM)	1µl
cDNA (in der jeweils gewünschten Verdünnung)	5µl
Nuclease-freies Wasser	2µl

- die Reaktionsansätze wurden in 384 Well-Platten pipettiert, mit selbstklebender Folie verschlossen und in das HT 7900er TaqMan Gerät gestellt.
- PCR Bedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit
UNG AmpErase Inkubation	50°C	2min
AmpliTaQ Gold Aktivierung	95°C	10min
PCR (45 Zyklen)		
– Denaturierung	95°C	15sec
– Annealing/Elongation	60°C	1min

Zielgene

Für die Versuche wurden ausnahmslos Assays On Demand der Firma Applied Biosystems verwendet.

Name	NCBI RefSeq Number	UniGene Nr.	Applied Biosystems ID
ABCA1	NM_005502.2	Hs.429294	Hs01059098_m1
ABCC4	NM_005845.2	Hs.508423	Hs00195260_m1
ABCG1	NM_207174.1	Hs.124649	Hs01555192_m1
ABCG2	NM_004827.2	Hs.480218	Hs00184979_m1
ABCG5	NM_022436.2	Hs.132992	Hs00223686_m1
ABCG8	NM_022437.2	Hs.413931	Hs00223690_m1
ADFP	NM_001122.2	Hs.3416	Hs00605340_m1
CPT1A	NM_001876.2; NM_001031847.1	Hs.503043	Hs00157079_m1
CYP1A1	NM_000499.2	Hs.72912	Hs00153120_m1
FABP1	NM_001443.1	Hs.380135	Hs00155026_m1
FADS1	NM_013402.3	Hs.503546	Hs00203685_m1
HMGCS2	NM_005518.2	Hs.59889	Hs00194145_m1
IL1 β	NM_000576.2	Hs.126256	Hs00174097_m1
IL8	NM_000584.2	Hs.449585	Hs00174103_m1
KRT20	NM_019010.1	Hs.84905	Hs00300643_m1
LCT	NM_002299.2	Hs.551506	Hs00158722_m1
MUCDHL	NM_021924.3; NM_031264.2	Hs.165619	Hs00229736_m1
PCK1	NM_002591.2	Hs.1872	Hs00159918_m1
PPAR δ	NM_006238.3	Hs.696032	Hs00606407_m1
PPAR γ	NM_015869.4; NM_005037.5; NM_138712.3; NM_138711.3	Hs.162646	Hs00234592_m1
RXR β	NM_021976.3	Hs.388034	Hs00232774_m1

SCAND1	NM_016558.2; NM_033630.1	Hs.584909	Hs00762801_s1
SCD	NM_005063.4	Hs.558396, Hs.597496	Hs00748952_s1
SLC25A20	NM_000387.3	Hs.13845	Hs00386383_m1
SOX18	NM_018419.2	Hs.8619	Hs00746079_s1
TNF α	NM_000594.2	Hs.241570	Hs00174128_m1

Tabelle 1: Analysierte Gene mit NCBI RefSeq Nummer, UniGene Nummer und Herstellerkennnummer

2.2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Essay (ELISA)

Der Enzyme Linked Immunosorbent Essay (ELISA) ist ein schnelles und zuverlässiges immunochemisches Testverfahren zum Nachweis eventuell in einer Probe vorhandener Antikörper. Antikörper binden an auf der ELISA Platte aufgebraute spezifische „Capture“-Antigene. Nach einem Waschgang werden die Proben mit einem sekundären Antikörper inkubiert, dessen F_c-Teil ein Biotinmolekül gebunden hat. Dieser bindet an die Antigen-Antikörper Konjugate. In einem weiteren Schritt wird Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) zugegeben, welche nach Bindung an das Biotinmolekül zu einem der Antikörperkonzentration proportionalen Farbumschlag führt. Diese Farbreaktion wird durch Zugabe von 1m Phosphorsäure gestoppt, anschließend wird die Absorption photometrisch bestimmt und mit den Standardkonzentrationen verglichen. Die Absorptionsmessung erfolgt mittels Spectra ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim; Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm. In dieser Arbeit wurden InstantELISA™ Kits für IL-1 β , IL-8 und TNF α von Bender MedSystems (Wien, Österreich) bezogen. Diese Kits haben gegenüber den normalen ELISA Kits den Vorteil, weniger Arbeitsschritte zu benötigen, da bei ihnen alle benötigten Reagenzien bereits gefriergetrocknet in den Wells vorhanden sind. Zusätzlich verfügen diese Kits über bereits fertig verdünnte Standardkonzentrationsreihen. Für unsere Versuchsreihen führten wir jeweils Doppel-Bestimmungen der jeweiligen Zellkulturüberstände durch.

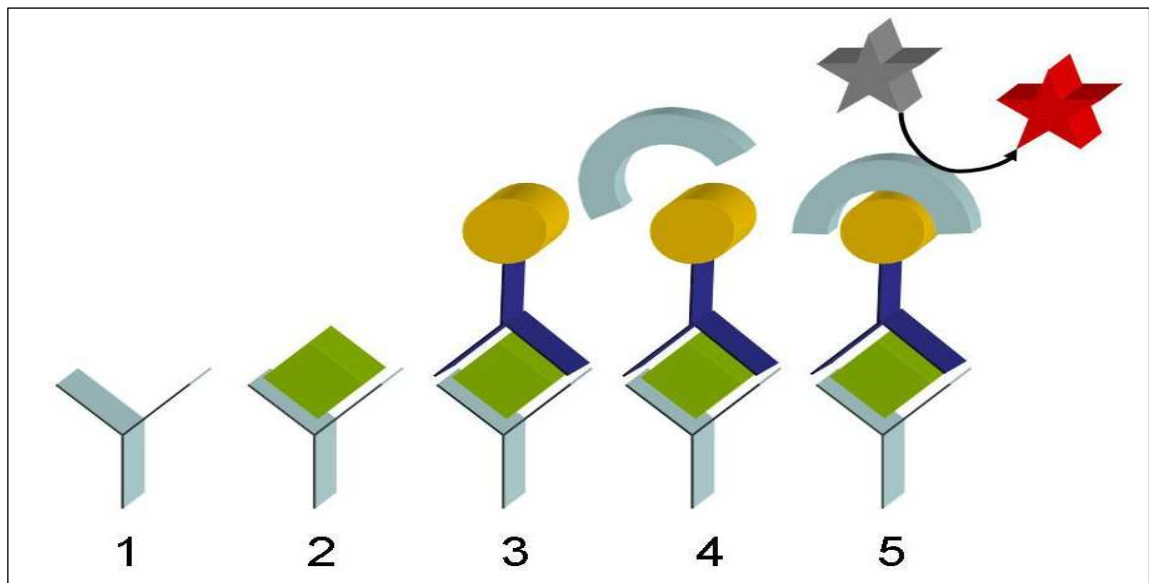


Abbildung 6: **Funktionsprinzip ELISA**

(1) mit Capture Antigen beschichtete Elisaplatte; (2) Antikörper bindet an Capture Antigen; (3) Sekundärer Antikörper bindet an Antigen-Antikörper-Komplex; (4) Streptavidin-HRP bindet an Biotingruppe des sekundären Antikörpers; (5) zur Antikörperkonzentration proportionale Farbreaktion

2.2.7 Datenauswertung

TaqMan

Zur Ermittlung der Ct (Threshold Cycle)-Werte wurde die Sequence Detector Software SDS 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Werte jenseits des 35. Zyklus wurden nicht mehr berücksichtigt. Zur Berechnung und graphische Darstellung wurden die ermittelten Werte in eine Excel Arbeitsmappe (Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA) übertragen.

Elisa

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentrationen wurde die Magellan Software (Tecan, Crailsheim, Deutschland) verwendet. Normgeraden wurden ebenfalls mit diesem Programm erstellt.

3 Ergebnisse

Am Beginn der Arbeit stand die Auswertung der durch unsere Arbeitsgruppe mittels Affymetrix Microarrays aus Caco2-Zellkulturen generierten Daten. Diese Zellkulturen wurden sowohl im undifferenzierten, als auch im differenzierten Stadium mit Rosiglitazone, GW501516, Aventis PPAR δ Aktivator sowie Aventis PPAR δ Antagonist in einer jeweiligen Konzentration von 1 μ mol/l für 24h inkubiert. Als Lösungsmittel wurde Ethanol eingesetzt, welches auch als Kontrollmedium für die Versuche diente. Nach der Zellernte wurde die jeweilige RNA zur Hybridisierung der Microarrays verwendet.

Hierbei erfolgte zunächst eine Selektion derjenigen Gene, bei denen reelle biologische Effekte durch eine Veränderung der Expression vermutet werden konnten. Aus der Vielzahl dieser potentiell regulierten Gene zeigt Tabelle 02 die in den Microarray-Untersuchungen tatsächlich auffälligen Gene. Hierbei wurden Gene aus verschiedenen Bereichen gefunden, so zum Beispiel aus der mitochondrialen β -Oxidation (SLC25A20, CPT1A), dem Zellstoffwechsel (HMGCS2, PCK1, KRT20, LCT, ADFP), der Detoxifikation (CYP1A1) sowie SOX 18, ein für einen Transkriptionsfaktor kodierendes Gen.

In einem weiteren Schritt wurde dann versucht, diese Ergebnisse mittels eines unabhängigen quantitativen Verfahrens zu validieren.

Dazu wurden zunächst TaqMan-Expressionsanalysen mittels RT-PCR durchgeführt. Aufgrund der großen Varianz der unabhängigen biologischen Replikate werden diese einzeln, als drei farblich von einander abgrenzbare Balken dargestellt. Die Expressionswerte stellen jeweils die relative Veränderung dar und beziehen sich auf die zur Versuchsreihen gehörende Ethanol-Kontrolle.

Im Anschluss an diese Untersuchungen folgten weitere TaqMan Analysen, zum Nachweis möglicher PPAR δ Effekte auf weitere Gene, für die sich mögliche PPAR δ Einflüsse vermuten lassen, so zum Beispiel im Bereich des Lipidstoffwechsels (FABP1, FADS, SCD1), der ABC Transporter sowie zum Ausschluss einer Zytokin-freisetzung die Entzündungsmediatoren Interleukin 1 β (IL 1 β), Interleukin 8 (IL 8) und Tumornekrosefaktor α (TNF α).

Pathway / Gen	Gensymbol	1d_Control_Signal	1d_p-Value	1d_Rosiglitazone	1d_GW501516	1d_PPARD Aktivator	1d_PPARD Antagonist	21d_Control_Signal	21d_p-Value	21d_Rosiglitazone	21d_GW501516	21d_PPARD Aktivator	21d_PPARD Antagonist
β-Oxidation													
Carnitin Palmitoyltransferase 1A (liver)	CPT1A	9,8	+	1,1	2,6	2,1	1,1	25,4	++	2,0	2,3	2,3	1,1
Solute Carrier Family 25 (Carnitin/Acylcarnitin Translocase)	SLC25A20	150,8	++	1,2	2,5	2,3	-1,1	327,4	++	1,5	1,3	1,5	1,1
Zellstoffwechsel													
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase 2	HMGCS2	121,4	++	2,3	6,5	4,9	-1,9	1270,4	++	2,0	2,0	1,9	1,0
Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1 (soluble)	PCK1	26,0	-	2,3	1,2	2,5	1,5	95,8	++	1,1	1,7	1,2	1,0
Keratin 20	KRT20	42,4	+	2,0	-1,1	1,3	1,3	83,7	++	1,1	2,5	1,2	1,2
Lactase	LCT	56,5	++	2,5	2,1	2,8	1,1	409,8	++	1,3	1,5	1,2	1,1
Adipose Differentiation Related Protein	ADFP	578,7	++	1,9	2,8	2,6	-1,1	1972,7	++	1,3	1,6	1,4	-1,1
Detoxifikation													
Cytochrom P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	175,8	++	1,0	1,0	1,0	4,6	88,2	++	1,1	1,3	1,1	2,8
Weitere differentiell exprimierte Gene													
SRY (sex determining region Y)-box 18	SOX18	61,1	++	3,5	2,8	7,0	1,6	1730,2	++	-1,1	1,0	1,0	-1,3

Tabelle 02: Affymetrix Microarrays

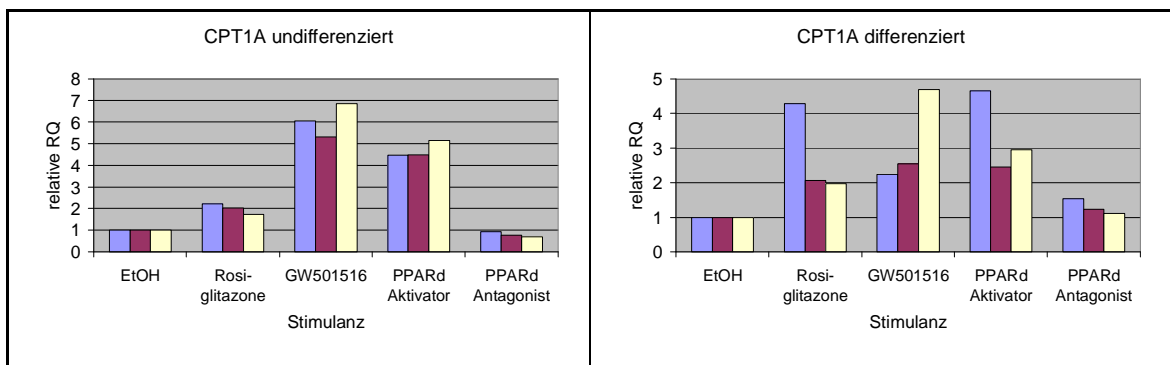
Tabelle 02 zeigt eine Auswahl der von uns untersuchten Gene, bei denen sich im Rahmen der Affymetrix Microarray Analyse besonders auffällige Expressionsänderungen fanden. P-Werte wurden mit + für $p < 0,05$ und mit ++ für $p < 0,01$ angegeben.

3.1 Lipidstoffwechsel

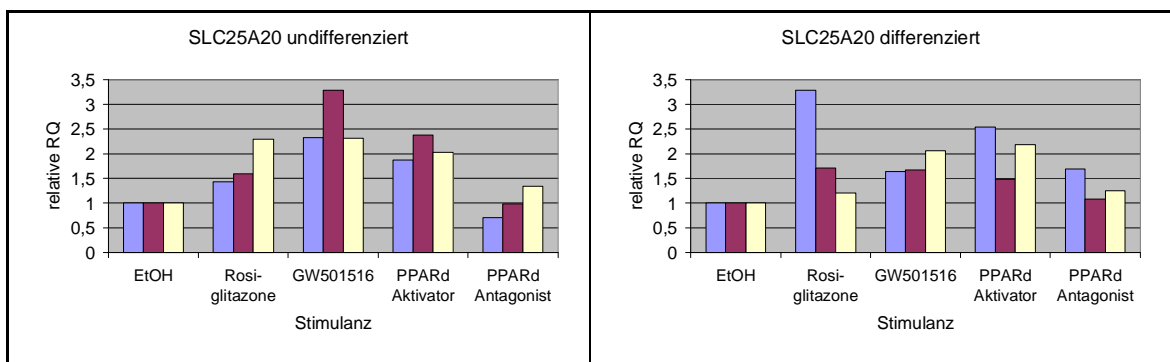
Hier liegt das Interesse auf den beiden, an der mitochondrialen β -Oxidation beteiligten Genen Carnitine Palmitoyltransferase 1A sowie Carnitine/Acylcarnitine Translocase. Für sie konnte in den Microarray Experimenten jeweils eine Hochregulierung der Genaktivität durch GW501516, sowie den PPAR δ Aktivator gezeigt werden. Die korrespondierenden Proteine dieser beiden Gene sind funktionell eng gekoppelt und spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Fettsäuren über die Mitochondrienmembran.

Da sich in der Literatur Hinweise über weitere, durch PPAR γ regulierte Gene im Lipidstoffwechsel finden lassen, wurden auch Fatty Acid Binding Protein (FABP1), Fatty Acid Desaturase (FADS1) sowie die Stearyl-CoA-Desaturase (SCD1) mittels TaqMan-Assay untersucht.

a)



b)



c)

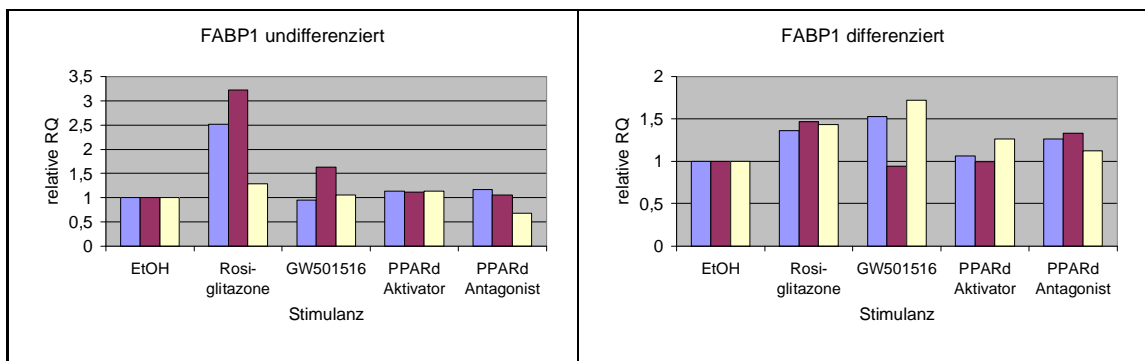
Abbildung 07: **Lipidstoffwechsel**

Abbildung 07 zeigt die beiden an der β -Oxidation beteiligten Gene a) CPT1A und b) SLC25A20 sowie c) FABP1. Die Grafik zeigt links die Ergebnisse für die nativen, rechts für die ausdifferenzierten Caco2-Zellen.

CPT1A

Die Carnitinpalmityltransferase 1A initiiert die mitochondriale β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren und stellt damit einen zentralen Regulationsmechanismus des zellulären Lipidstoffwechsels dar.

Es zeigt sich (Abb. 07, a) bei den undifferenzierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Expression, vor allem durch GW501516. Ebenso konnten auch der PPAR δ Aktivator und Rosiglitazone eine signifikante Erhöhung der CPT1A Expression hervorrufen. Die Expression von CPT1A bei Gabe des PPAR δ Antagonisten hingegen blieb, wenn auch nicht signifikant, unter dem Wert der Ethanolkontrolle.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den differenzierten Caco2-Zellen. Hier erkennt man ebenfalls eine deutliche Zunahme der Expression bei Stimulation mit GW501516, Rosiglitazone und PPAR δ Aktivator. Es scheint allerdings, als wäre bei den differenzierten Zellen der PPAR δ Aktivator das am stärksten stimulierende Agens. Dieser Unterschied ist aber gegenüber GW501516 nur marginal. Der PPAR δ Antagonist hat bei den differenzierten Caco2-Zellen keinen Einfluss auf die CPT1A Expression.

Hierbei zeigt sich, dass die in den Microarrays gefundenen Ergebnisse mit denen der TaqMan-Assays übereinstimmen und somit verifiziert werden konnten.

SLC25A20

Die Carnitin / Acylcarnitintranslocase fungiert als Transporter von Acylcarnitin über die innere Mitochondrienmembran. Daher stellt SLC25A20 einen wichtigen Baustein der zellulären Fettsäureoxidation dar und bildet den Substratdonor für die oben genannte Carnitinpalmitoyltransferase.

In Abb. 07, b zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei CPT1A. Bei den undifferenzierten Zellen steht eine Steigerung der Expression durch GW501516 im Vordergrund, allerdings führt auch der PPAR δ Aktivator zu einer signifikanten Erhöhung der Expression, Rosiglitazone zeigt ebenfalls einen Trend zur Aktivierung der Expression von SLC25A20. Bei den differenzierten Zellen lässt sich diese Überexpression nicht ganz so deutlich darstellen, jedoch zeigt sich ebenfalls ein Trend, dass sowohl Rosiglitazone als auch GW501516, aber allen voran der PPAR δ Aktivator hier eine Hochregulation der Carnitin / Acylcarnitintranslocase hervorrufen.

Die hier gefundenen Ergebnisse decken sich, wie schon bei CPT1A mit denen der Microarray Versuche.

FABP1

Das FABP1-Gen kodiert für das Fatty Acid Binding Protein, ein Protein, das für die Bindung von Fettsäuren und anderen hydrophoben Liganden in humanen Leberzellen zuständig ist. Darüber hinaus findet sich FABP1 auch in Darmzellen und kann dort Gallensäuren binden.

Bei den Versuchen (Abb. 07, c) zeigte sich für die differenzierten Zellen keine Änderung des FABP1 Expressionsmusters durch unsere Reagenzien. Bei den undifferenzierten Zellen jedoch zeigte sich in zwei unserer Versuche ein signifikanter Anstieg der FABP1 Expression bei Stimulation durch Rosiglitazone. Darüber hinaus kann aber ebenfalls keine der anderen Substanzen eine Änderung der Expression hervorrufen, hier liegen die Werte alle im Bereich der normalen Schwankungen.

FADS1

Fatty Acid Desaturase kodiert für ein Protein, das in die Acylketten gesättigter Fettsäuren Kohlenstoff-Doppelbindungen einbaut. Dadurch werden gesättigte Fettsäuren in ungesättigte umgewandelt.

Für die Fatty Acid Desaturase (nicht dargestellt) zeigt sich unter keiner der Inkubationsbedingungen eine signifikante Änderung des Expressionsmusters. Alle Ausschläge befinden sich deutlich innerhalb des von uns als signifikant gewerteten Maßes. Lediglich bei den differenzierten Zellen findet sich bei einem der drei Versuche bei Stimulation mit dem PPAR δ Aktivator ein mit 2,16 knapp über den Grenzwert erhöhter Ausschlag der Expression, die beiden anderen Versuchsreihen waren jedoch unterhalb der Signifikanzgrenzen.

SCD1

Die Stearyl-CoA-Desaturase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Synthese von ungesättigten Fettsäuren. Dieses eisenhaltige Enzym bildet hauptsächlich Oleinsäure, die durch Desaturierung von Stearinsäure entsteht. Die Rate der Umwandlung ist ein limitierender Faktor von Zellwachstum und Differenzierung durch Auswirkungen auf die zelluläre Membranfluidität und Signaltransduktion.

Bei den Versuchen, die hier nicht dargestellt sind, zeigte sich bei keiner der Inkubationsbedingungen sowohl für undifferenzierten, wie auch die differenzierten Caco2-Zellen eine signifikante Änderung der SCD1 Expression.

3.2 Zellstoffwechsel

Hier liegt das Augenmerk auf denjenigen der in den Microarrays auffälligen Gene, deren Funktion im Bereich des Zellstoffwechsels liegen. Hierzu zählen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Synthase 2 (HMGCS2), Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PCK1), Keratin 20 (KRT20) sowie das Adipose Differentiation Related Protein (ADFP), auch Adipophilin genannt. Bei dieser Gruppe handelt es sich um eine relativ inhomogene Gruppe mit Genen aus verschiedenen Bereichen des Zellstoffwechsels. Aus diesem Grund werden sie auch einzeln besprochen.

HMGCS2

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Synthase 2 (HMGCS2) ist ein auf Chromosom 1 gelegenes Gen, das vor allem in Leber und Kolon exprimiert wird und dessen Protein eine wichtige Rolle in der Ketonkörpersynthese spielt. Die Expression von HMGCS2 steigt mit dem Grad der Differenzierung der Kolonepithelzellen. In Kolonkarzinomzellen findet sich hingegen eine Unterexpression von HMGCS2 als Zeichen der fehlenden Differenzierung(30).

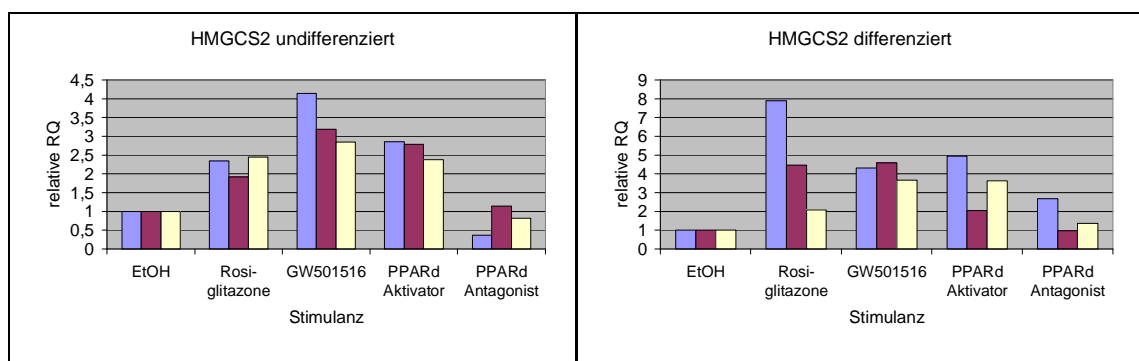


Abbildung 08: **HMGCS2**

Die Abbildung zeigt die Expressionsmuster der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Synthase 2 in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2 Zellen.

Bei der Expressionsanalyse von HMGCS2 zeigt sich in den undifferenzierten Zellen eine deutliche Hochregulation bei den mit Rosiglitazone, GW501516 und PPAR δ Aktivator behandelten Caco2-Kulturen. Hier liegen alle drei Inkubationsbedingungen über dem Grenzwert, es kann also von einer signifikanten Zunahme der HMGCS2 Expression ausgegangen werden. Bei den ausdifferenzierten Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild, hier findet sich in allen stimulierten Ansätzen mit Ausnahme der des PPAR δ Antagonisten eine signifikanten Hochregulation, allerdings muss man für einen der Versuche feststellen, dass der mit PPAR δ Antagonist stimulierte Ansatz ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression aufweist.

PCK1

Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodiert für ein Protein im Zytosol, welches eine zentrale Rolle als Regulator bei der Gluconeogenese spielt.

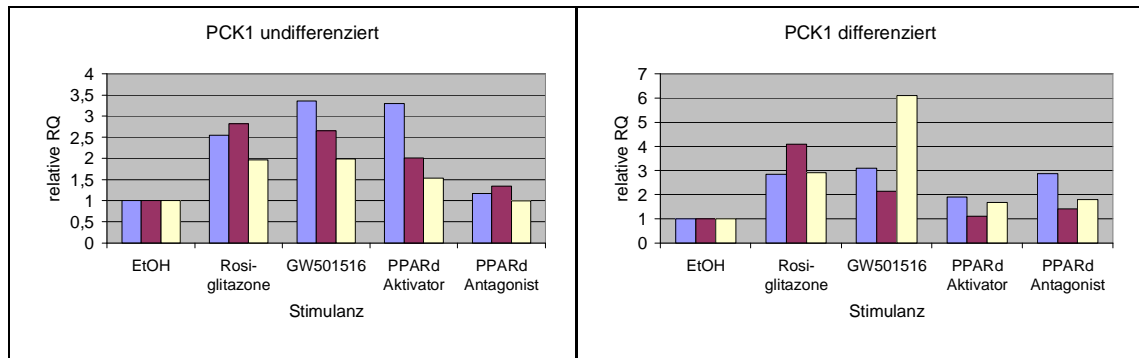


Abbildung 09: **PCK1**

Expressionsanalyse von Phosphoenolpyruvat Carboxykinase in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellkulturmodellen.

Bei der Analyse der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase Expression zeigt sich, dass vor allem GW501516 zu einer Hochregulation von PCK1 führt. In den undifferenzierten Zellen hat Rosiglitazone einen nur minimal geringeren Effekt, ebenso zeigt der PPARδ Aktivator eine signifikante Zunahme der PCK1 Expression. Die Gabe des PPARδ Antagonisten hingegen ändert nichts an der Expression von PCK1. Bei den differenzierten Zellen zeigt sich hier vor allem bei GW501516 und Rosiglitazone ein Effekt. Der bei den undifferenzierten Zellen für PPARδ Aktivator gesehene Anstieg der Expression lässt sich hier nicht erkennen, die Werte liegen auf einem ähnlichen Niveau wie beim PPARδ Antagonist. Bei PCK1 zeigt sich im Vergleich zu den Microarray Voruntersuchungen, dass es bei den PCR Ergebnissen der undifferenzierten Caco2-Zellen auch zu einer Zunahme der Expression von PCK1 bei Gabe von GW501516 gekommen ist. Dies lässt sich bei den Microarrays aber nicht erkennen. Bei den differenzierten Zellen ließen die Microarray Untersuchungen keine gesteigerte Expression für PCK1 erwarten, es zeigte sich dann aber sowohl für Rosiglitazone als auch GW501516 eine signifikante Erhöhung der Expressionswerte.

KRT20

Keratin 20 ist ein wichtiges Protein der Keratinfamilie, das spezifisch in ausdifferenzierten Enterozyten und Becherzellen der Magen- und Darmschleimhaut exprimiert wird. Es dient daher als Marker für die Differenzierung von Enterozyten.

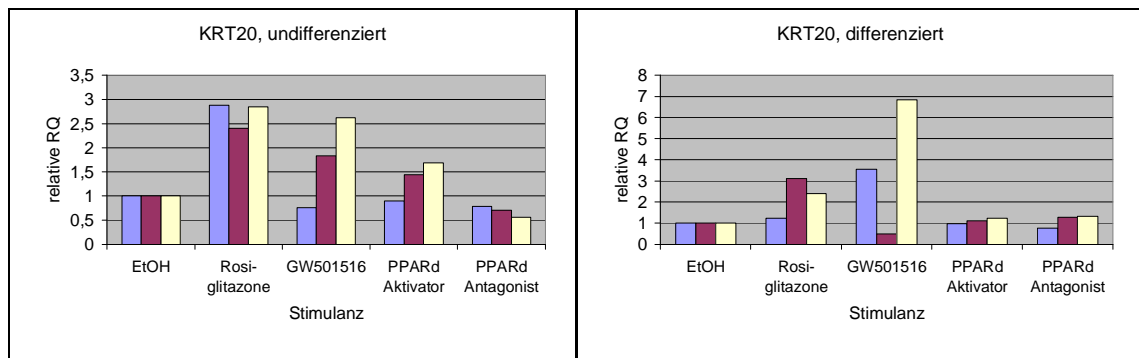


Abbildung 10: **KRT20**

Die Abbildung zeigt die Expressionsmuster für KRT20 in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellen.

Für die Expression von KRT20 zeigt sich vor allem bei den undifferenzierten Caco2-Zellen eine Hochregulierung von KRT20 durch Rosiglitazone. Dieses bestätigt sich auch mit Einschränkungen für die differenzierten Zellen (Abb. 10). Auch eine gewisse Stimulierung durch GW501516 kann nicht ausgeschlossen werden, da sowohl bei den undifferenzierten, viel mehr aber noch bei den differenzierten Caco2-Zellen jeweils zwei der drei Versuche eine Erhöhung der Expression von KRT20 aufweisen. Weder bei den undifferenzierten noch bei den differenzierten Zellen lässt sich jedoch ein Einfluss von PPAR δ Aktivator bzw. Antagonist auf die Expression von KRT20 erkennen.

Lactase

Ein weiteres Gen, das in unseren Microarray Untersuchungen eine deutliche Änderung durch PPAR-Stimulation aufweist, ist Lactase (LCT). Es zeigen sich bei den Microarray Analysen (Tab. 02) eine signifikante Erhöhung der LCT Expression sowohl bei den undifferenzierten, als auch den differenzierten Caco2-Zellen für Rosiglitazone, GW501516 und den PPAR δ Aktivator. Wie in Abb. 11 dargestellt, zeigt sich bei den undifferenzierten Caco2-Zellen für Lactase eine deutliche, signifikante

Erhöhung durch Stimulation mit Rosiglitazone und GW501516, sowie ein Trend für den PPAR δ Aktivator. Für die differenzierten Caco2-Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild, hier finden wir ebenso eine signifikante Erhöhung der LCT Expression durch Rosiglitazone und GW501516. Auch zeigt sich für den PPAR δ Aktivator ein Trend zur erhöhten Expression von LCT, jedoch stellt man einen ähnlichen, wenn auch nicht ganz so deutlich ausgeprägten Trend auch für den PPAR δ Antagonist fest.

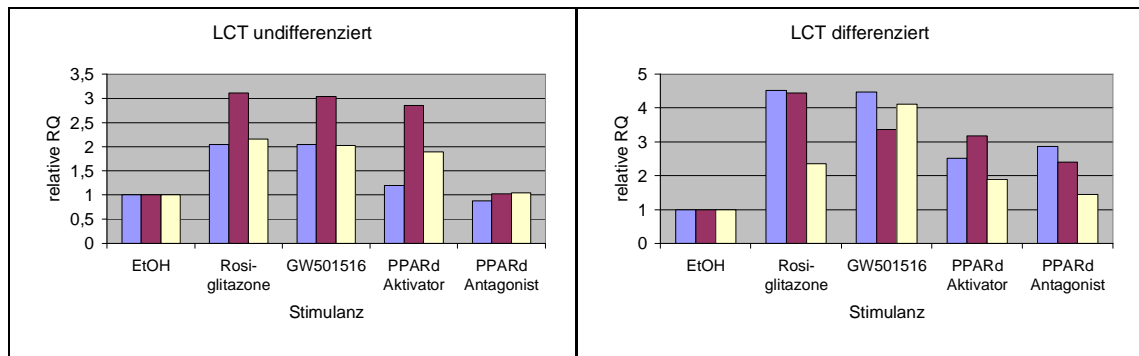


Abbildung 11: **Lactase**

Die Abbildung zeigt die TaqMan Werte für Lactase in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellen.

ADFP

Adipophilin stellte ein wichtiges Oberflächenprotein der Lipidtröpfchen in Adipozyten dar. Die Expression von ADFP ist eines der ersten Anzeichen für eine Ausdifferenzierung von Adipozyten.

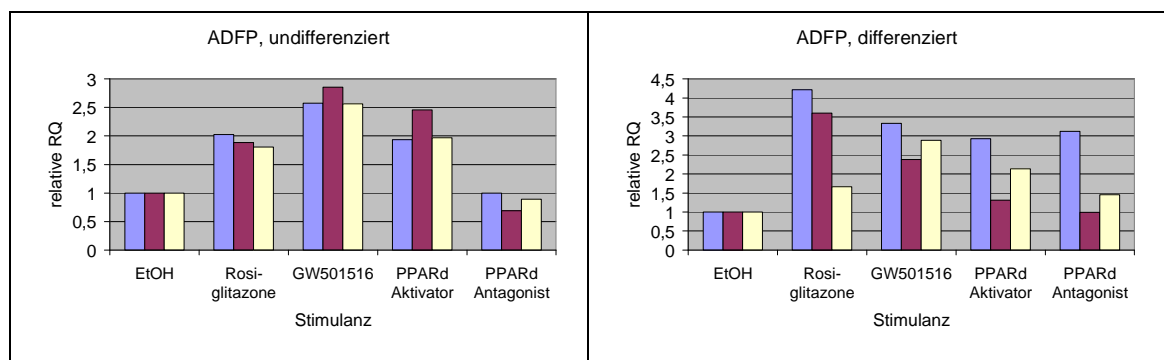


Abbildung 12: **ADFP**

Die Abbildung zeigt die TaqMan Werte für Adipophilin (ADFP) in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellen.

Wie in Abb. 12 ersichtlich ist, zeigt sich bei den undifferenzierten Caco2-Zellen eine deutliche Erhöhung der ADFP Expression bei den drei Stimulanzen Rosiglitazone, GW501516 und PPAR δ Aktivator. Außer bei GW501516 liegen die von uns ermittelten Werte knapp unterhalb der Grenze der Signifikanz von 2, daher kann hier nur von einem, wenn auch deutlich erkennbarem Trend der Hochregulation der ADFP Expression gesprochen werden.

Bei den differenzierten Caco2-Zellen liegen die mit GW501516 stimulierten Zellen mit ihrer ADFP Expression ebenfalls über der Signifikanzschwelle. Bei Rosiglitazone und PPAR δ Aktivator liegen jeweils zwei von drei gemessenen Expressionen über dem Schwellenwert. Auch hier zeigt sich eine Zunahme der ADFP Expression. Allerdings muss man bei der Betrachtung der Einzelwerte hier festhalten, dass sich bei den Versuchen relativ starke Schwankungen zeigen und man bei der ersten Zellreihe für den PPAR δ Antagonist ähnlich hohe Werte wie der PPAR δ Aktivator hervorruft.

Auch hier zeigt sich wie schon bei SLC25A20 und CPT1A eine enge Korrelation der nach den Microassays zu erwartenden Expressionen mit den tatsächlich in den TaqMan-Assays feststellbaren Expressionsmustern.

3.3 Detoxifikation

Im Bereich der Medikamentenmetabolisierung spielen vor allem Cytochrome der Familie P450 eine wichtige Rolle. Darüber hinaus spielen Cytochrome auch eine Rolle bei der Synthese von Cholesterin, Steroiden und anderen Fetten. Von uns wurden im Rahmen der Microarray Untersuchungen aus dem Bereich der Phase I Detoxifikation die Gene CYP1A1 (Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1), CYP1A11 (Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 11) und PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2) untersucht. Hier fällt auf, dass der PPAR δ Antagonist eine Erhöhung der CYP1A1 Expression hervorruft, die beiden anderen untersuchten Gene jedoch keine Änderung der Expression zeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde CYP1A1 daraufhin mittels real-time-RT-PCR untersucht.

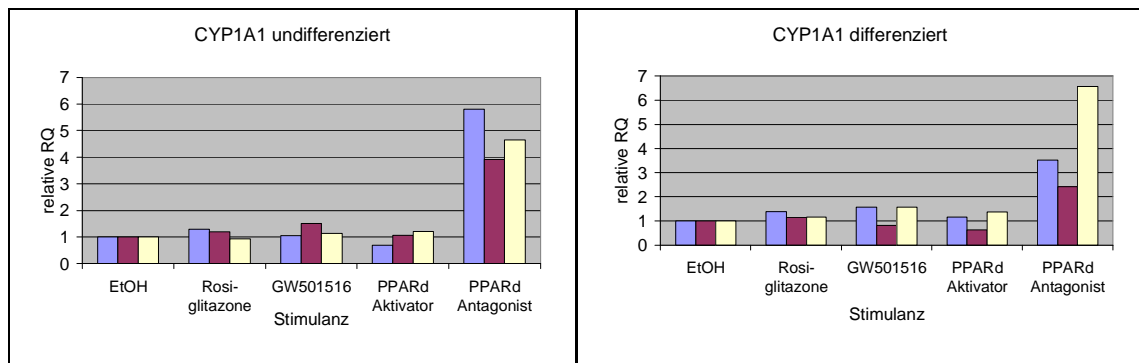
Abbildung 13: **CYP1A1**

Abb. 13 zeigt die verschiedenen Expressionsmuster für Cytochrom P 1A1. Die Analysen wurden durchgeführt an undifferenzierten (links) sowie differenzierten (rechts) Caco2-Zellkulturmodellen. Die unterschiedlichen farbigen Balken stehen jeweils für einen gemeinsamen Experimentieransatz.

Bei der Expressionsanalyse von Cytochrom P1A1 zeigt sich sowohl bei den undifferenzierten, wie auch bei den differenzierten Caco2-Zellen eine signifikante Erhöhung der Genexpression bei Gabe des PPAR δ Antagonisten. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Microarray Vorversuchen überein und bestätigen damit unsere Vermutungen, dass die Hemmung von PPAR δ eine Erhöhung der CYP1A1 Expression zu Folge hat.

3.4 ABC-Transporter Expressionsanalysen

Im Bereich der ABC Transporter unterscheiden wir zwei Gruppen. Zum einen die Gruppe, deren Hauptmerkmal der Transport von Lipiden und anderen Substraten über die Zellmembran ist, hierzu gehören ABCG5, ABCG8, ABCA1 und ABCG1. Hier legen wir unsere Aufmerksamkeit vor allem auf die Effekte, die eine Änderung der PPAR δ Aktivierung auf die Expression der ABC Transporter und die damit einher gehenden Veränderungen im Bereich des Lipidtransports der Enterozyten mit sich bringt. Die zweite Gruppe besteht aus ABCC4 und ABCG2, deren Funktion vor allem im Bereich der Multi-Drug-Resistance liegt. Ihre Funktionen sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird eine mögliche Interaktion bzw. Veränderung der Pharmakokinetik anderer Medikamente vermutet. Ziel hier ist es, eine mögliche Expressionsänderung durch die PPAR δ Modulation zu überprüfen und gegebenenfalls weiter zu untersuchen.

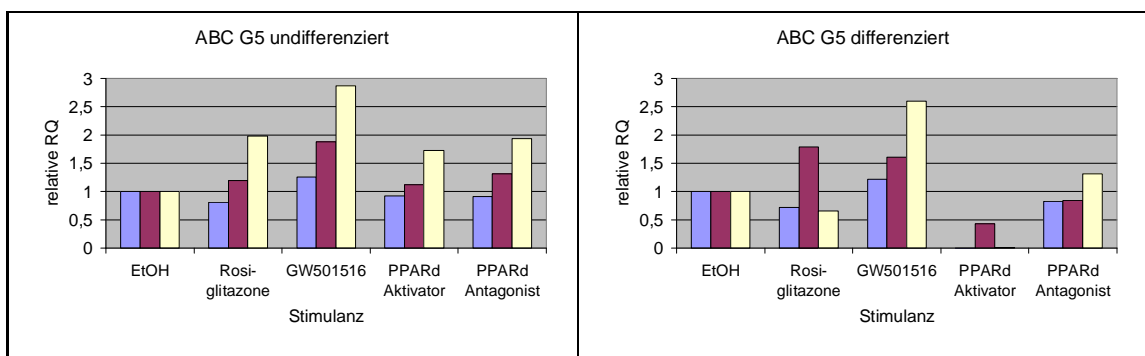
Im Folgenden wird die erste Gruppe der ATP-Binding-Cassette Transporter, ABCG5, ABCG8, sowie ABCA1 und ABCG1 dargestellt.

ABCG5 und ABCG8 sind Heterodimere, das heißt, sie bilden eine Verbindung in der Zellmembran, bei der sich jeweils eine ABCG5 und ein ABCG8 Domäne zu einem gemeinsamen Transporter zusammenschließen. Sie sind bei der Ausschleusung von Cholesterin und Sterolen aus den Dünndarmepithelzellen zurück in das Darmlumen beteiligt. Darüber hinaus regulieren sie die Sekretion von Sterolen in die Gallenflüssigkeit. Fehlt einer der beiden Partner und ist somit die Dimerisation dieser Half-Size-Transporter nicht möglich, so sind sie funktionslos, wie zum Beispiel bei der seltenen Stoffwechselerkrankung β -Sitosterolämie (31). Die enge Verbindung der beiden Gene zeigt sich auch darin, dass sie als Tandemstruktur auf Chromosom 2 angeordnet sind (32).

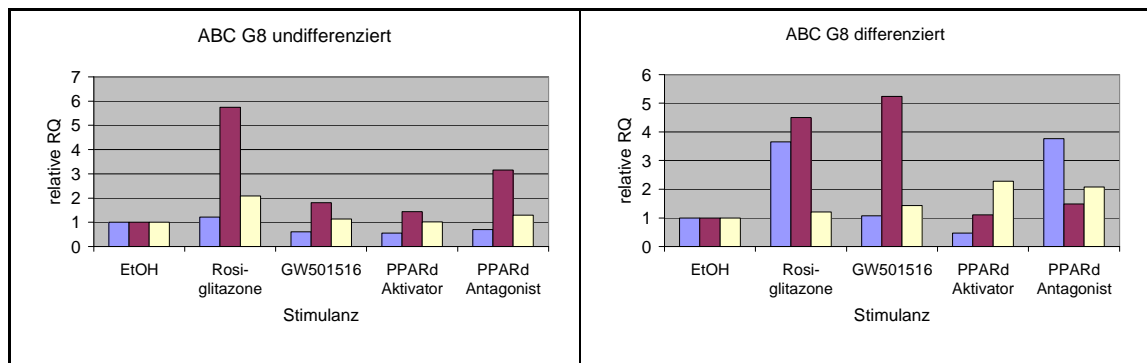
ABCA1 ist ein weiteres, wie ABCG5 und ABCG8 durch Sterol induziertes Mitglied dieser Genfamilie. Es hat Cholesterin als Substrat und ist am zellulären Fettstoffwechsel beteiligt. Im Gegensatz zu ABCG5 und ABCG8, die isoliert im Darm und der Leber vorkommen, ist ABCA1 in relativ vielen Geweben und Zellen zu finden, so zum Beispiel in Macrophagen, Hepatozyten, Darmzellen und plazentären Trophoblasten (33). ABCA1 ist in der Plasmamembran sowie intrazellulär lokalisiert und erleichtert den Lipidtransport zu extrazellulären Empfängern oder aufgenommenen apo-A1. Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass ABCA1 Expression für die Aufnahme von Sterolen und lipophilen Vitaminen in die Dünndarmschleimhaut essenziell ist (34).

ABCG1, das zuerst entdeckte Mitglied dieser Gruppe, spielt nachweislich eine Rolle beim Lipid- und Cholesteroltransport in Makrophagen (35). Zusätzlich wird eine Beteiligung von ABCG1 an weiteren Lipideffluxmechanismen des Körpers diskutiert.

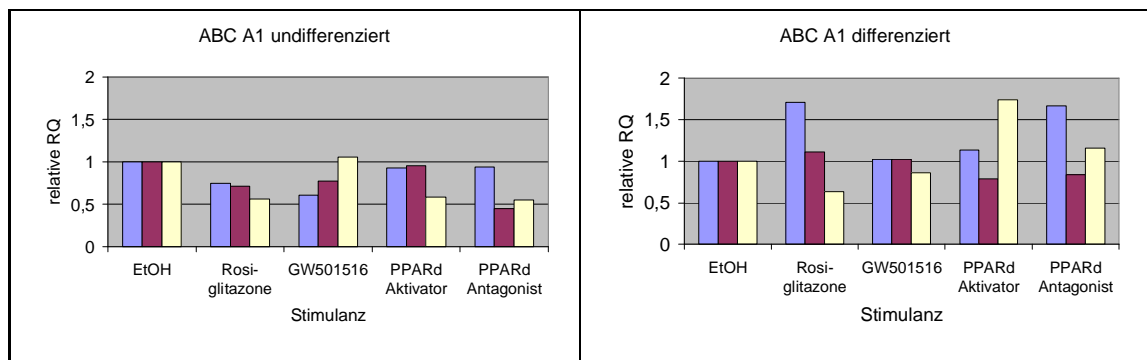
a)



b)



c)



d)

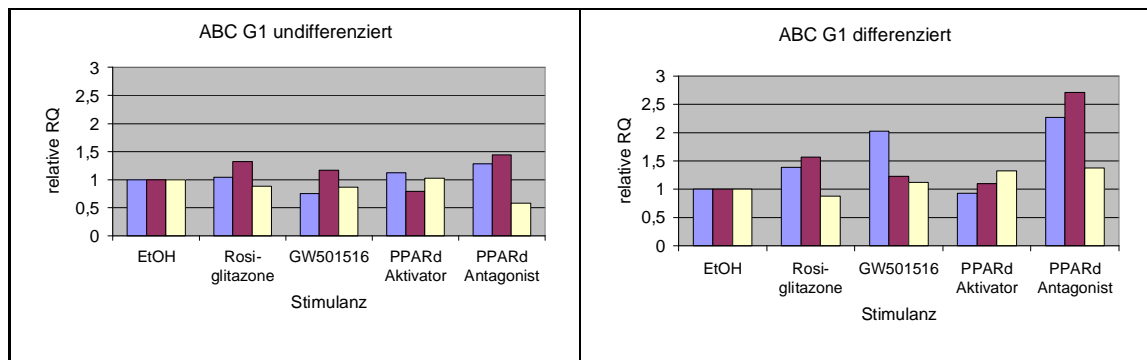
Abbildung 14: **ABC Transporter G5, G8, A1 und G1**

Abb. 14 zeigt die Expressionsanalysen für a) ABCG5, b) ABCG8, c) ABCA1 und d) ABCG1. Die Analysen wurden durchgeführt an undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellkulturmodellen. Die unterschiedlichen farbigen Balken stehen jeweils für einen gemeinsamen Experimentieransatz. Aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen der Expressionen wurden diese als Einzelbalken dargestellt.

ABCG5, ABCG8

Bei der Expressionsanalyse von ABCG5 (Abbildung 14, a) zeigt sich bei den undifferenzierten Caco2-Zellen ein Trend zur Hochregulation der Expression durch GW501516, die Werte liegen aber unter der für uns als signifikant bezeichneten Schwelle von 2,0. Bei den differenzierten Zellen findet sich hingegen eine deutliche Herabsetzung der Expression von ABCG5 durch Gabe des PPAR δ Aktivators ($<0,5$). Ein Effekt des PPAR δ Antagonisten lässt sich weder bei den undifferenzierten, noch bei den differenzierten Caco2-Zellen erkennen.

Für das zweite Mitglied der Heterodimerstruktur, ABCG8 (Abbildung 14, b), zeigt sich bei den undifferenzierten Zellen bei zwei der mit Rosiglitazone stimulieren Ansätze eine deutliche Hochregulation der ABCG8 Expression, beim dritten Ansatz lässt sich im Vergleich zu den anderen Stimulationsbedingungen ebenfalls ein Trend zur erhöhten Expression erkennen. Eine PPAR δ Stimulation bleibt aber ohne Auswirkung auf die Expression. Bei den differenzierten Zellen, also denjenigen, die Dünndarm-spezifische Expressionsmuster aufweisen, findet sich ebenfalls bei Rosiglitazone eine erhöhte ABCG8 Expression, darüber hinaus aber vor allem bei der Gabe des PPAR δ Antagonisten.

ABCA1

Die in Abbildung 14, c dargestellte Expressionsanalyse für ABCA1 zeigt bei den undifferenzierten Caco2-Zellen eine gewisse Abnahme der Expression unter Rosiglitazone. Hierbei liegen die Einzelwerte allerdings knapp über der von uns festgelegten Grenze von 0,5. Darüber hinaus lässt sich bei zwei der drei mit PPAR δ Antagonist inkubierten Ansätze eine Tendenz zum Rückgang der Expression erkennen. Diese Ergebnisse lassen sich für die differenzierten Caco2-Zellen jedoch nicht finden. Hier liegen alle gemessenen Expressionswerte im Rahmen der normalen Schwankung.

ABCG1

ABCG1 ist das vierte Gen dieser Gruppe. Wie in Abbildung 14, d zu erkennen ist, führt keine der von uns verwendeten Substanzen bei den undifferenzierten Caco2-

Zellen zu einer signifikanten Änderung des Expressionsmusters für ABCG1. Bei den ausdifferenzierten, also den Dünndarm-Enterozyten gleichenden Caco2-Zellen, findet sich jedoch ein eindeutiger Trend zur Hochregulierung der ABCG1 Expression bei der Gabe des PPAR δ Antagonisten. Hier liegen zwei der drei Einzelwerte jeweils über der von uns festgelegten Signifikanzgrenze von 2,0. Die Einzelwerte betragen hier 2,27 für die erste, beziehungsweise 2,7 für die zweite Messung.

Für die erste Gruppe der ABC-Transporter lässt sich für kein einheitliches Bild einer Expressionsänderung erkennen. Es finden sich allenfalls gewisse Hinweise auf eine Veränderung der Expression, hier vor allem bei Rosiglitazone und auch beim PPAR δ Antagonisten.

Als zweite Gruppe der ATP-Binding-Cassette Transporter untersuchten wir ABCC4 und ABCG2, zwei mutmaßlich an der Multi-Drug-Resistance beteiligte ABC Transporter. Wir verwendeten auch für diese Untersuchungen den bekannten Versuchsansatz mit EtOH-Kontrolle, Rosiglitazone, GW501516, PPAR δ Aktivator und PPAR δ Antagonist.

ABCC4

ABCC4 wird derzeit als eines der Schlüsselvektoren für eine Multi-Drug-Resistance betrachtet. Aus diesem Grund war es für uns sehr wichtig, eine mögliche Veränderung der Expression dieses MDR-Gens durch PPAR δ Einflüsse zu untersuchen.

Die Expressionsanalyse von ABCC4 (nicht gezeigt) wies aber sowohl bei den undifferenzierten als auch den differenzierten Caco2-Zellen ein Expressionsmuster auf, das bei allen Inkubationsbedingungen im Normbereich lag. Eine Modulation der Expression durch PPAR δ kann also für ABCC4 nicht festgestellt werden.

ABCG2

Der ebenfalls im Multi-Drug-Resistance Bereich vermutete ABCG2 ist das letzte der von uns untersuchten Gene der ABC-Familie. Es wird auch aufgrund seiner speziellen, bei der Brustkrebsentstehung stark limitierenden Eigenschaft, Breast

Cancer Resistance Protein (BRCP) genannt. Häufig eingesetzte Chemotherapeutika wie zum Beispiel Anthracycline, Doxorubicin und Irinotecan stellen Substrate für ABCG2 dar. Außer beim Mamma-Karzinom findet sich eine erhöhte ABCG2 Expression bei einer Vielzahl weiterer solider Tumore, in erhöhtem Maße vor allem bei Magen-, hepatozellulären und Kolonkarzinomen sowie in kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Melanomen (36).

Aus diesem Grund war eine Analyse der ABCG2 Expression für uns von großer Wichtigkeit, um eine zusätzliche negative Wirkung durch PPAR δ Einflüsse auf die Therapie möglicher Zweiterkrankungen auszuschließen.

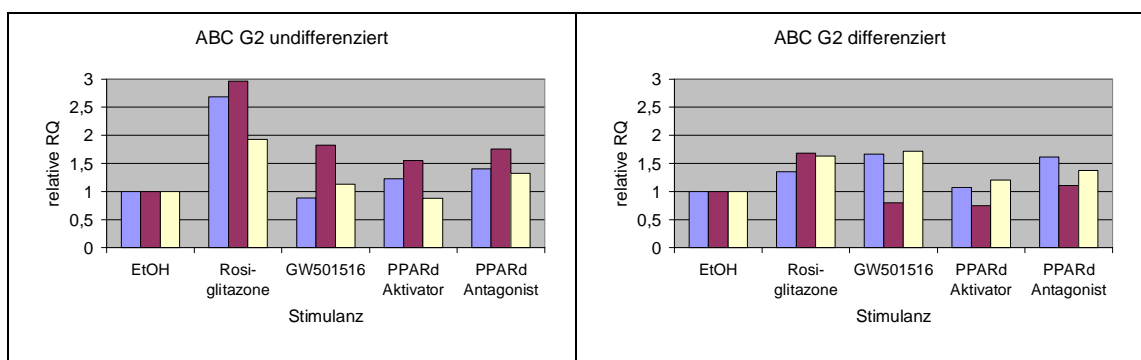


Abbildung 15: **ABCG2**

Expressionsanalyse von ABCG2 in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellen.

In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass es bei Rosiglitazone zu einer signifikanten Zunahme der ABCG2 Expression in zwei der drei Versuche kommt. Auch der dritte Einzelversuch liegt mit einem Wert von 1,92 nur knapp unter der Signifikanzgrenze von 2,0. Für die von uns untersuchten PPAR δ Modulatoren findet sich jedoch weder bei den undifferenzierten, Kolonepithelzellen entsprechenden Caco2-Zellen, noch bei den differenzierten Caco2-Zellen eine signifikante Expressionsänderung.

Die Untersuchungen an den beiden Multi-Drug-Resistance Genen ABCC1 und ABCG2 zeigen, dass weder der PPAR δ Aktivator, noch der PPAR δ Antagonist bei humanen Darmzellen einen regulierenden Einfluss besitzt. Dieses Erkenntnis ist wichtig, da sich hieraus keine negativen Effekte auf therapeutische Ansätze zur Tumorbekämpfung bei soliden Tumoren ergeben.

3.5 PPAR

Zusätzlich zu den von uns bei den Microarray Untersuchungen gefundenen Genen haben wir auch PPAR δ und PPAR γ als Kontrollen analysiert. Darüber hinaus war für uns auch noch der von PPAR als Heterodimer gebundene ligandenaktivierte Transkriptionsfaktor Retinoid-X-Rezeptor von Interesse, um mögliche Wechselwirkungen der PPAR Stimulation auf den funktionell eng mit PPAR verknüpften RXR zu überprüfen.

PPAR δ

Die PPAR δ Expression wurde als primäres Ziel unserer Untersuchungen ebenfalls analysiert. Hier sind besonders die Effekte des PPAR δ Aktivators und PPAR δ Antagonisten von Interesse, zusätzlich lassen sich auch mögliche Cross-Aktivierungen erkennen.

Bei den unstimulierten Caco2-Zellen (nicht gezeigt) fällt einzig ein gewisser Trend der Down-Regulierung der PPAR δ Aktivität durch den PPAR δ Antagonisten auf. Diese Werte liegen aber über der Grenzwelle von 0,5. Bei den ausdifferenzierten Zellen liegen alle Werte im Normbereich.

Hier zeigt sich, dass weder der PPAR δ Aktivator, noch der PPAR δ Antagonist in der Lage sind, die Expression von PPAR δ zu beeinflussen.

PPAR γ

Da Rosiglitazone als PPAR γ Ligand eines unserer Substrate darstellt, wurde von uns auch PPAR γ als Referenz mitbestimmt, um mögliche Einflüsse auf die Messungen auszuschließen.

Auch hier finden wir weder bei Rosiglitazone noch bei den anderen Inkubationsbedingungen eine Veränderung der PPAR γ Expression (nicht gezeigt). Bei den undifferenzierten Caco2-Zellen liegen alle Expressionswerte zwischen 0,7 und 1,2, also deutlich in dem von uns festgelegten Normbereich. Bei den ausdifferenzierten Zellen findet sich ebenfalls ein nicht signifikant verändertes Expressionsmuster für PPAR γ .

RXR β

Da RXR β als zweiter Bestandteil der Heterodimere aus PPAR und RXR eine mögliche Auswirkung auf die Effekte der PPAR δ Modulation haben könnte, haben wir auch die Expression des RXR-Gens untersucht.

Bei den Retinoid-X-Rezeptor Expressionsanalysen zeigt sich, dass weder PPAR δ Aktivator, PPAR δ Antagonist oder eines der anderen Substrate eine signifikante Veränderung der RXR β Expression hervorrufen konnten. Es lässt sich darüber hinaus auch kein Trend in jegliche Richtung erkennen.

3.6 Entzündungsmediatoren

Um eine mögliche Induktion von Entzündungsmediatoren durch Gabe des PPAR δ Aktivators auszuschließen, wurden von uns zusätzliche TaqMan Expressionsanalysen für Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 8 (IL8) sowie Tumornekrosefaktor α (TNF α) durchgeführt.

Interleukin 1 β

Das Protein, für das das IL1 β Gen kodiert, gehört zur Gruppe der Interleukin 1 Zytokine. Es handelt sich hierbei um einen durch aktivierte Makrophagen sezernierten Entzündungsmediator, der sowohl bei der Zelldifferenzierung, der Proliferation als auch bei der Apoptose von Zellen eine wichtige Rolle spielt.

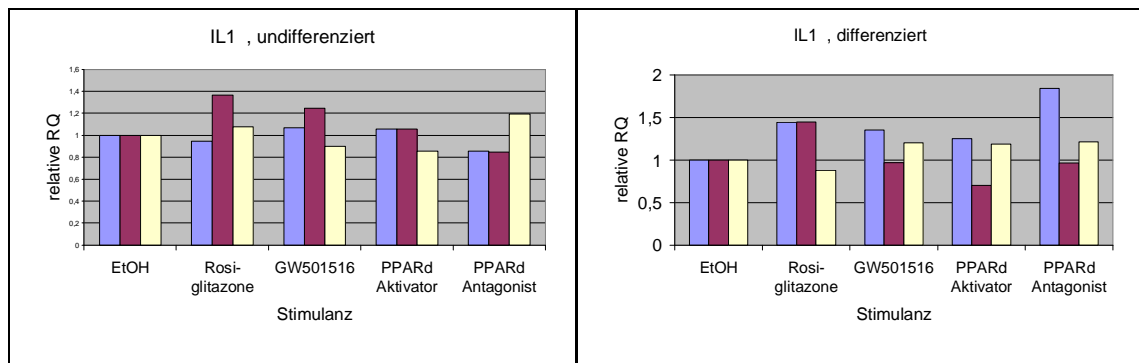


Abbildung 16: IL1β

Abb. 16 zeigt die Expressionsmuster von IL1β in undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Caco2-Zellen. Abbildung XX steht stellvertretend für die anderen Mitglieder der Entzündungsmediatoren.

In den TaqMan Expressionsanalysen für IL1β zeigt sich weder bei den undifferenzierten Zellen, noch bei den differenzierten Caco2-Zellen eine signifikante Änderung der Interleukin 1β Expression. Alle Werte liegen innerhalb der normalen Varianz der Expression zwischen 0,5 und 2,0.

Interleukin 8

Bei Interleukin 8 handelt es sich um ein Chemokin aus der Familie der CXC Chemokine und stellt einen Hauptmediator bei Entzündungsprozessen dar. IL8 wird von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert, führt zur Chemotaxis von Leukozyten, vor allem natürlichen Killerzellen und Neutrophilen. Hiermit trägt IL-8 zum Heilungsprozess bei, jedoch auch zur Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis. Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise auf eine gesteigerte Entstehungs-, Proliferations- und Metastasierungsrate für kolorektale Karzinome unter dem Einfluss von IL8(37).

In den durchgeführten TaqMan Analysen für IL8 (nicht gezeigt), finden sich jedoch für keine der Inkubationsbedingungen eine signifikante Änderung der IL8 Expression. Lediglich bei einem Versuchsansatz in den undifferenzierten Caco2-Zellen kann eine Herabsetzung der IL8 Expression bei GW501516 beobachtet werden, die beiden anderen Ansätze jedoch weisen normale IL8 Expressionswerte auf.

Tumornekrosefaktor α

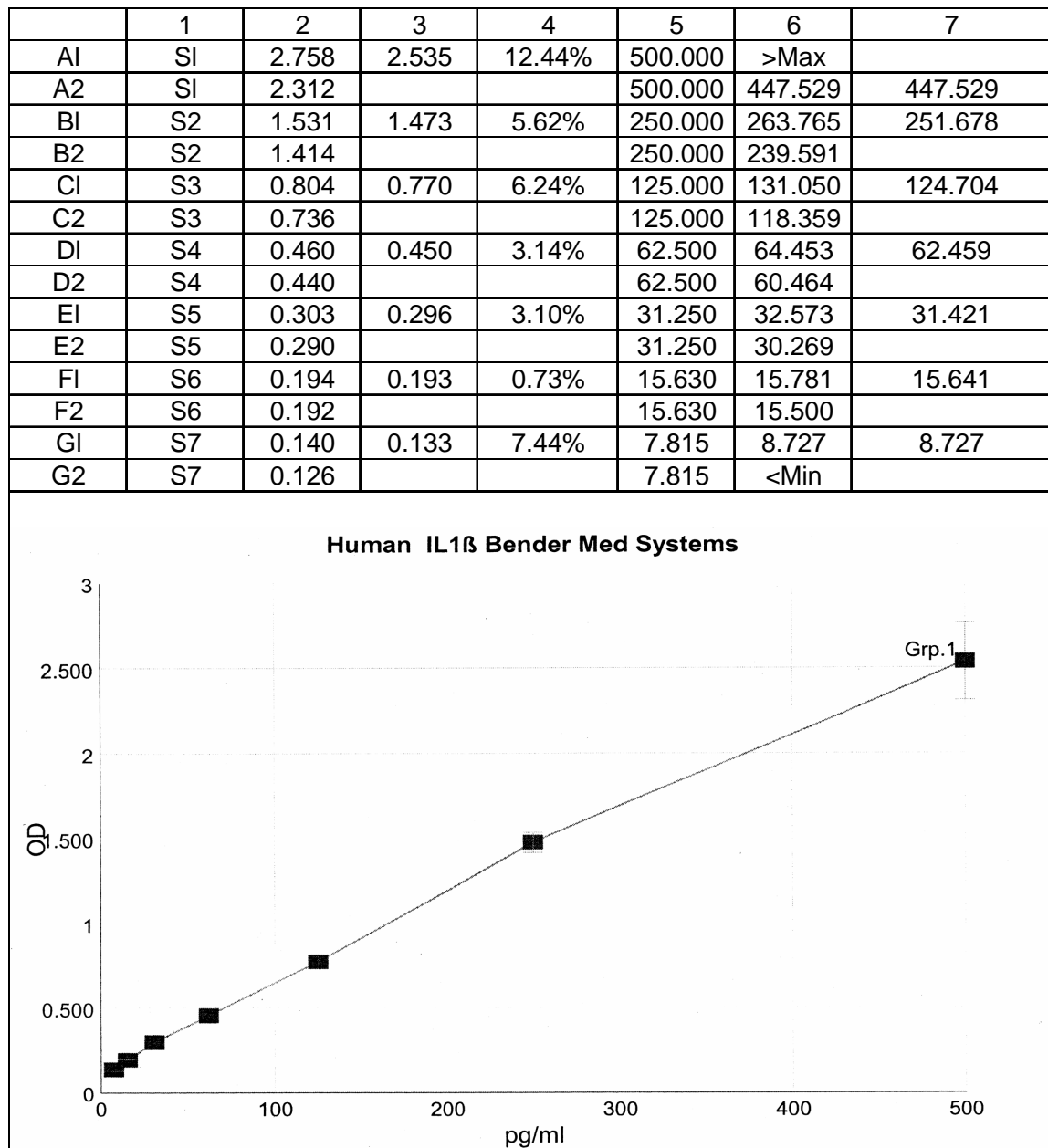
Als drittes Zielgen in der Gruppe der Entzündungsmediatoren haben wir den Tumornekrosefaktor α untersucht. TNF α ist ein Zytokin, das an einer Vielzahl von Prozessen, z.B. Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Lipidstoffwechsel- und Gerinnungsfunktionen beteiligt ist. Es wird auch ein Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter Tumoren, Insulinresistenz und Autoimmunerkrankungen vermutet. Für unsere Studien ist TNF α vor allem aus Sicht der Insulinresistenz und der Tumorigenese von Interesse.

Bei den TaqMan Assays (nicht gezeigt) finden sich ausnahmslos Ct-Wert größer 35, also jenseits der Grenze, die eine valide Aussage über eine Expressionsänderung erlauben würde. Aufgrund dieser hohen Werte kann davon ausgegangen werden, dass TNF α nicht in den von uns untersuchten Proben exprimiert wird.

Zur weiteren Validierung der TaqMan Ergebnisse wurde zusätzlich noch ein ELISA-Immunoassay für die beiden Interleukine IL1 β und IL8, sowie TNF α erstellt. Hierzu wurde der bei der Zellernte entnommene und anschließend tiefgekühlte Zellkulturüberstand verwendet.

Die verwendeten ELISA haben eine Nachweisgrenze von 0,7 pg/ml für IL1 β , 1,3 pg/ml für IL8 und von 1,65 pg/ml für TNF α .

Hier können weder für die beiden Interleukine noch für den Tumornekrosefaktor α Werte oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt werden. Die richtige Funktion der Tests wird durch eine Eichgerade sichergestellt (Abb. 17).

Abbildung 17: **ELISA**

In Abb. 17 sind die ELISA-Werte der Standardreihe sowie die Eichgerade exemplarisch für IL1 β aufgezeigt. 1: Sample-ID, 2: Messwert, 3: Mittelwert, 4: Variationskoeffizient, 5: Standardkonzentration, 6: Einzelkonzentration, 7: Mittelwert Einzelkonzentration. Die Messwerte der Proben waren unterhalb der Nachweisgrenze und sind daher nicht dargestellt. Die Ergebnisse für IL8 und TNF α waren unauffällig und werden hier ebenfalls nicht gezeigt.

Es hat sich sowohl in den TaqMan Assays als auch in den anschließend durchgeführten ELISA kein Hinweis auf eine gesteigerte Expression oder auf eine mögliche Sezernierung von Entzündungsmediatoren in den Zellkulturüberstand ergeben.

3.7 Weitere differentiell exprimierte Gene

Als weiteres, bei den Microarray Analysen auffälliges Gen, wurde das Sex-Determining-Region Y, Box 18 (SOX18) Gen untersucht. Hier zeigen sich bei den Microarray Analysen der undifferenzierten Caco2-Zellen eine deutlich erhöhte Expression für SOX18 bei Rosiglitazone, und GW501516, vor allem jedoch beim PPAR δ Aktivator (Tabelle 2). Bei den daraufhin durchgeführten TaqMan Assays hingegen findet sich keine Erhöhung der Expression für SOX 18, weder bei den undifferenzierten, noch bei den differenzierten Caco2-Zellen (nicht gezeigt). Vielmehr zeigen sich hier, in allen untersuchten Zellreihen Ct-Werte größer 35, das heißt außerhalb des Bereichs, für den valide Aussagen getroffen werden können.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit kam eine Kombination aus High-Density-DNA-Microarray-Technologie mit einer Real-Time-RT-PCR Methode zur effizienten mRNA-Expressionsanalyse sowie bei ausgewählten Genen eine ELISA-Untersuchung zum Einsatz. Hier kommt der Vorteil der Affymetrix-DNA-Microarrays zum tragen, der es ermöglicht, bei einer Vielzahl verschiedener Gene gleichzeitig die Expressionsmuster zu untersuchen. Dies erlaubt zum einen, interessante Gene für die weitere Untersuchung mittels TaqMan-Assay auszuwählen und zum anderen, funktionell eng gekoppelte Gene in einem gemeinsamen Ansatz zu betrachten. Für diese Arbeit wurden Microarray Analysen eingesetzt, um Gene zu selektieren, welche bei Gabe des PPAR γ Agonisten Rosiglitazone, der beiden PPAR δ stimulierenden Substanzen GW501516 und PPAR δ Aktivator oder den PPAR δ Antagonisten eine Änderung ihres Expressionsmusters im Vergleich zur Ethanolkontrolle aufweisen, beziehungsweise wie am Beispiel ATP-Binding-Cassette Transporter eine enge funktionelle Korrelation zu PPAR zeigen.

Hierzu muss allerdings angemerkt werden, dass alle auf mRNA gefundenen Ergebnisse durch eine weitere Untersuchung auf Proteinebene validiert werden müssen.

Nach der Auswertung der Microarrays wurden weitere Zellkulturpopulationen mit den oben genannten Medien inkubiert und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR untersucht.

Es konnten, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, für einige der selektierten Gene eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Microarrays nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen Genen wiesen einige weitere Gene interessante Expressionsmuster auf, die im Folgenden näher diskutiert werden sollen.

4.1 PPAR δ Einflüsse auf den Lipidstoffwechsel

CPT1A und SLC25A20

Die leberspezifische Carnitin / Palmitoyltransferase 1A steht in engem funktionellem Zusammenhang mit der Carnitin / Acylcarnitin Translocase. Hierbei wandelt CPT1 extramitochondriale, mit Coenzym A (CoA) veresterte Fettsäuren in freies CoA und Acylcarnitin um, welches wiederum von der Carnitin / Acylcarnitin Translocase zur Carnitin / Palmitoyltransferase 2 auf der inneren mitochondrialen Membran transportiert wird. Auf diesem Wege gelangen die extramitochondrialen Fettsäuren in die Mitochondrien, wo sie als Energielieferant für die dort stattfindende β -Oxidation dienen. Bereits Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde erkannt, dass CPT1 eine Schlüsselrolle bei der Fettsäureoxidation in der Leber spielt (38). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass CPT1 eine wichtige Funktion als Regulator zwischen der hepatischen Fettsäuresynthese und der β -Oxidation mit nachfolgender Ketonkörperproduktion erfüllt (39). Auch konnte von verschiedenen Forschungsgruppen eine Beteiligung der CPT1 an der Regulation der Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen nachgewiesen werden (40-42).

Diese Vorergebnisse und unsere Microarray Analysen decken sich mit den gefundenen Ergebnissen sowohl für CPT1A als auch SLC25A20. Die signifikant erhöhten CPT1A Expressionswerte für GW501516 und PPAR δ Aktivator bei den undifferenzierten, wie auch den differenzierten Caco2 Zellen legen einen Einfluss auf die CPT1A Expression durch PPAR δ nahe. Diese Vermutung stützt auch der von uns aber lediglich bei den undifferenzierten Caco2 Zellen gefundene Trend zur Expressionsminderung von CPT1A durch den PPAR δ Antagonist. Die in ähnlichem Maße wie bei CPT1A nachgewiesene Expressionserhöhung für SLC25A20 erklärt sich hierbei aus der engen funktionellen Korrelation der beiden Transporter. Es muss allerdings geklärt werden, ob PPAR δ oder die vorhergehende Expressionserhöhung von CPT1A die Ursache für die erhöhte SLC25A20 Expression sind.

Lassen sich die in der genomischer Ebene gefundenen Ergebnisse auf Proteinebene reproduzieren, so hat man hiermit eine wirksame Methode, den hepatischen Fettsäurestoffwechsel zu Gunsten einer verstärkten Fettsäureoxidation zu beeinflussen. Hierbei wird gleichzeitig auch die hepatische Fettsäuresynthese und somit die Bildung von VLDL verringert. Man darf allerdings nicht außer Acht lassen,

dass es durch die gesteigerte β -Oxidation auch zu einem Anstieg der Ketonkörper im Organismus kommt und etwaige Risiken einer Azidose daher abgewogen werden müssen. Auch zeigt sich hier in Zusammenschau mit von *Chatelain et al.* gefundenen Ergebnissen für PPAR α (43) ein möglicher Ansatz für die Therapie des beim Diabetes Typ 2 gefundenen Hyperinsulinismus auf Ebene der pankreatischen Insulinsekretion.

FABP1

FABP1, auch L-(liver)-FABP genannt, spielt eine zentrale Rolle im intrazellulären Lipidstoffwechsel und Transport. Die Funktion des von FABP1 kodierten Proteins besteht in der Bindung von langkettigen Fettsäuren und dem daraus resultierenden Transport in die Zelle. Weiterhin stellt FABP1 einen Angriffspunkt für Lipidsenker aus der Gruppe der Fibrate dar (44). In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lipidsenker in der Lage waren, eine erhöhte Expression von L-FABP sowie Enzymen der mitochondrialen β -Oxidation mittels PPAR α Aktivierung zu erzielen (45). Auch findet sich eine Vielzahl von Berichten, über eine enge funktionelle Korrelation zwischen FABP1 und PPAR α (46), sowie auch über eine gewisse, im Vergleich zu PPAR α aber verringerte PPAR γ Interaktion. Wolfrum et al. sowie *Gupta et al.* zeigen für HepG2 Zellen beziehungsweise für Moser S Kolonkarzinomzellen, dass es keine gegenseitige Beeinflussung zwischen PPAR δ und FABP1 gibt (47, 48).

Unsere Versuche zeigen für das Fatty Acid Binding Protein 1 lediglich bei den undifferenzierten Caco2 Zellen einen deutlichen Trend zur Hochregulierung der FABP1 Expression durch Rosiglitazone, für PPAR δ findet sich in keinem unserer Ansätze eine veränderte FABP1 Expression. Diese Ergebnisse sind mit denen von *Wolfrum et al.* für HepG2 erhaltenen Ergebnissen konsistent und legen einen von PPAR δ unabhängigen Aktivierungsweg für Fatty Acid Binding Protein 1 nahe. Allerdings stehen sie im Widerspruch zu den in der Einleitung zitierten Ergebnissen von *Poirer et al.*, die für einen kombinierten PPAR α /PPAR δ Agonisten (GW2433) im Dünndarm von PPAR α Knock-out Mäusen eine gesteigerte FABP1 Expression zeigen können (17). Weiterhin lässt dieses Ergebnis die Frage zu, ob FABP1 ebenso wie FABP4, das ein bekanntes Zielgen für PPAR γ ist (49) und mittels RXR Dimerisierung aktiviert wird (50), in Caco2 ebenfalls einen RXR vermittelten

Aktivierungsweg aufweist. In diesem Zusammenhang jedoch lassen die oben zitierten Ergebnisse von *Wolfrum et al.* einen Einfluss durch RXR zumindest bei HepG2 Zellen nicht erkennen. Für eine genauere Bestimmung möglicher Interaktion zwischen RXR und FABP1 in humanen Darmzellen müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Generell lässt sich aber für FABP1 sagen, dass die für PPAR α und PPAR γ gefundenen Interaktionen sich in unseren Versuchen für PPAR δ nicht nachweisen lassen und daher eine potentielle Beeinflussung des Lipidtransfers mittels PPAR δ Aktivator nicht gezeigt werden können.

FADS1, SCD1

Die beiden an der Synthese von ungesättigten Fettsäuren beteiligten Gene Fatty Acid Desaturase 1 und Stearyl-CoA-Desaturase 1 waren bei den von uns durchgeführten Untersuchungen unauffällig. Es konnte keine Beeinflussung der Expression durch eines der PPAR beeinflussenden Mittel gefunden werden. In der Literatur finden sich jedoch Berichte, denen zufolge es bei bestimmten Haplotypen durch eine erhöhte FADS1 Aktivität bei fettreicher Ernährung zu einer Zunahme des Arterioskleroserisikos kommt (51). In anderen Studien jedoch wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Arteriosklerose und einer erniedrigten FADS1 Aktivität hergestellt (52). Allerdings finden sich nirgends in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer PPAR δ Stimulation und einer daraus resultierenden Änderung der FADS1 Aktivität.

Stearly-CoA-Desaturase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Umwandlung von gesättigten Fettsäuren in einfach ungesättigte Fettsäuren. Hierbei entstehen vor allem Palmitolein- und Ölsäure, zwei der am häufigsten im menschlichen Körper vorkommenden einfach ungesättigten Fettsäuren (53).

Für SCD1 konnte von *Yao-Borengasser et al.* eine Korrelation zwischen PPAR γ Stimulierung und einem Anstieg der SCD1 mRNA in menschlichem Fett- sowie Muskelgewebe gezeigt, sowie durch die Gabe eines PPAR γ Agonisten (Pioglitazone) eine gesteigerte Fettneubildung erzielt werden (54). Eine andere Studie hingegen zeigt für adipöse Ratten eine Normalisierung der SCD1 Expression bei der längerfristigen Behandlung mit Rosiglitazone. In diesem Versuchsaufbau wurden

jedoch Zellen der Rattennieren untersucht (55), was mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Studien sein kann.

In unserem Bereich interessanter sind die Ergebnisse von *Mar-Heyming et al.*, die bei Patienten mit familiärer Dyslipoproteinämie eine gesteigerte SCD1 Expression finden sowie eine schwache Korrelation zwischen SCD1 Expression und PPAR γ Aktivität herstellen konnten (56). Weitere Arbeitsgruppen hingegen zeigen, dass durch Behandlung mit Troglitazone eine Verringerung der SCD1 mRNA erreicht werden kann (57, 58), hierbei wurden aber in beiden Fällen 3T3-L1 Mausadipozyten verwendet. Eine sehr interessante Entdeckung machten *Riséus et al.*, die bei der Behandlung von Typ2-Diabetikern mit Rosiglitazone eine erhöhte SCD1, sowie FADS1 Expression in humanen Fettzellen zeigen konnten (59).

Allerdings muss auch gesagt werden, dass bisher keine Publikationen über mögliche Effekte von PPAR δ auf die Expression von FADS1 oder SCD1 zu finden sind. Bei unseren Versuchen stellte sich zunächst die Frage, warum die von anderen beschriebenen Expressionserhöhungen durch PPAR γ in unseren Versuchen nicht bestätigt werden konnten. Als mögliche Erklärung hierfür dient das von uns verwendete Zellkulturmodell mit humanen Caco2 Darmzellen, wohingegen bei den anderen Versuchen entweder Myo- oder Adipozyten, beziehungsweise Nagetiermodelle verwendet wurden. Darüber hinaus bietet sich die weitere Untersuchung der PPAR δ agonistischen Wirkung auf diese Gene in anderen Zelltypen des menschlichen Organismus an, allen voran die bereits für PPAR γ untersuchten Myo- und Adipozyten.

4.2 Zellstoffwechsel

Im Rahmen des Zellstoffwechsels wurden die in den Microarray Untersuchungen auffälligen Gene 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Synthase 2 (HMGCS2) und Phospho-enolpyruvat Carboxykinase1 (PCK1) sowie Keratin 20 (KRT20), Lactase (LCT) und Adipose Differentiation Related Protein (ADFP) untersucht.

HMGCS2

Hierbei handelt es sich um ein auf Chromosom 1 gelegenes Gen, das als Gradmesser der Differenzierung der Kolonepithelzellen gilt. Die Expression von HMGCS2 steigt hierbei mit der fortschreitenden Differenzierung an. Interessanterweise findet sich beim kolorektalen Karzinom eine deutlich erniedrigte HMGCS2 Expression als Zeichen der fehlenden Differenzierung (30).

Zusätzlich zu der Funktion als Marker besitzt HMGCS2 eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel. Hierbei acetyliert es in den Mitochondrien Acetoacetyl-CoA zu HMG-CoA, eine Reaktion, die den ersten Schritt in der mitochondrialen Ketonkörpersynthese darstellt (60).

Unsere Experimente zeigen, dass es bei Gabe von PPAR δ -stimulierenden Substanzen ebenso wie bei Rosiglitazone zu einer deutlichen Erhöhung der HMGCS2 Expression kommt. Sollten sich diese Ergebnisse auf Proteinbasis bestätigen, so führt die PPAR δ -Stimulation zu einem weiteren energieverbrauchenden Schritt unter erneuter Bildung von Ketonkörpern. Untersuchungen für PPAR α an HepG2 Zellen zeigen, dass sich durch PPAR α Agonisten ebenfalls eine Induktion der HMGCS2 mRNA erzielen lässt (61).

Weiterhin konnte von uns gezeigt werden, dass zumindest die kurzzeitige Stimulation mit PPAR δ wirksamen Substanzen keine Herabsetzung der Zelldifferenzierung in den Caco2-Zellen zur Folge hatte. Allerdings muss hierbei gesagt werden, dass unsere Inkubationsdauer von 24 Stunden sehr kurz ist und daher weitere Studien für die Langzeitwirkungen erfordern.

PCK1

Die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase ist der zentrale Regulator für die Glukoneogenese. Dieses, im Cytosol lokalisierte Enzym, katalysiert unter GTP-Verbrauch die Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Oxalacetat. Die Aktivität kann durch Glucagon, Glucokortikoide, cAMP und Retinolsäure hochreguliert werden, Insulin hingegen hat einen hemmenden Einfluss auf die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase Aktivität. Diese Studien zeigen auch, dass hierbei Insulin eine dominierende Rolle in der Unterdrückung der Glukoneogenese besitzt, und daher wird hier bei einem relativen Insulinmangel ein Zusammenhang mit der Entstehung

von Diabetes mellitus vermutet (62). Im Fettgewebe spielt PCK1 eine wichtige Rolle bei der Glyceroneogenese. Hierbei entsteht mittels einer „verkürzten“ Gluconeogenese 3-Glycerol-Phosphat, welches wiederum entscheidend für die erneute Veresterung von freien Fettsäuren ist (63). Dadurch kommt es zu einer verringerten Freisetzung nicht-veresterter Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Andere Studien haben ergeben, dass eine gesteigerte Ausschüttung dieser nicht-veresterten Fettsäuren zu einer Insulinresistenz führen können (64).

Von uns konnte gezeigt werden, dass es vor allem in den undifferenzierten, also dem Kolonepithel ähnelnden Zellen zu einer Expressionserhöhung durch den PPAR γ Agonisten Rosiglitazone sowie durch die beiden PPAR δ stimulierenden Substanzen kam. Bei den differenzierten Zellen fanden wir im Vergleich zu den Microarray Untersuchungen überraschenderweise eine Expressionszunahme für PCK1 durch Rosiglitazone und GW501516, jedoch nicht für den PPAR δ Aktivator. Diese Tatsache ist sehr interessant, da es sich hier um den einzigen Fall handelt, bei dem die TaqMan Untersuchungen abweichende Ergebnisse von den vorhergegangenen Microarrays zeigen. Die Ursache hierfür ist noch unklar.

Die Aktivierung von PCK1 durch Rosiglitazone ist aus der Literatur bekannt, jedoch geben *Glorian et al.* an, in ihren Studien durch PPAR δ Aktivatoren keine erhöhte Expression von PCK1 erreichen zu können (65) und stehen somit im Gegensatz zu der hier gefundenen Expressionserhöhung. Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass sich die Ergebnisse dieser Gruppe auf Adipozyten und Leberzellen stützen und es bei der Aktivierung von PCK1 durch PPAR Liganden zellspezifische Unterschiede gibt.

Weiterhin bedarf die genaue physiologische Folge dieser Expressionserhöhung zusätzlicher Untersuchungen, da sich in der Literatur unterschiedliche Effekte einer erhöhten PCK1 Expression finden lassen. So berichten *Frankhauser et al.* von einem erhöhten Adipositasrisiko durch eine gesteigerte PCK1 Expression im Fettgewebe (66). Andererseits zeigen Studien auch, dass es hierbei durch die verringerte Bildung von nicht-veresterten Fettsäuren zu einer Verminderung der Insulinresistenz kommen kann (67).

KRT20

Keratine sind faserbildende Strukturproteine und haben eine entscheidende Funktion bei der Stabilisierung und Form der Zellen. Darüber hinaus dienen Keratine auch als selektive Marker für den Zelltyp und den Entwicklungsstand der jeweiligen Zellen. Das von uns untersuchte Keratin 20 kommt vor allem in Enterozyten und Becherzellen der Magen- und Darmschleimhaut vor und ist ein Marker für die Ausdifferenzierung dieser Zellen (68). Weiterhin kann Keratin20 auch zur Feststellung eines Primärtumors dienen, da KRT20 relativ spezifisch von Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts exprimiert wird (69).

Unsere Ergebnisse zeigen für den PPAR γ Agonisten Rosiglitazone eine deutlich erhöhte KRT20 Expression bei den undifferenzierten und, in geringerem Maße, auch bei den differenzierten Caco2 Zellen. Diese decken sich mit den Ergebnissen von *Gupta et al.*, die bei der Stimulation von Darmzellmodellen mit PPAR γ aktivierenden Substanzen ebenfalls eine erhöhte KRT20 Expression zeigen konnten (70).

Wir waren darüber hinaus die ersten, die bei den undifferenzierten Zellen für den PPAR δ Aktivator eine erhöhte KRT20 Expression zeigen konnten. Diese durch PPAR δ ausgelöste Expressionssteigerung konnte durch GW501516 bestätigt werden. Für die dem Dünndarmepithel ähnelnden differenzierten Zellen lässt sich jedoch beim PPAR δ Aktivator keine Erhöhung der KRT20 Expression feststellen. Bei GW501516 hingegen finden sich in zwei von drei Fällen deutlich erhöhte KRT20 Werte.

Bei PPAR δ unterscheiden sich unsere Ergebnisse bei den undifferenzierten Caco2-Zellen jedoch deutlich von *Gupta et al.*, die bei PPAR δ Stimulation keine Erhöhung der KRT20 Expression zeigen konnten. Dieser Unterschied liegt aber möglicherweise in den verwendeten Substanzen begründet, da von *Gupta et al.* ein anderer PPAR δ Agonist (GW1514) verwendet wurde. Weiterhin kamen auch andere Darmzellmodelle zum Einsatz (48). Andererseits konnte von uns bei den differenzierten Zellen für den PPAR δ Aktivator ebenfalls keine erhöhte KRT20 Expression erzielt werden. Sie liegt auf dem selben Maß wie beim PPAR δ Antagonisten. Hier stellt sich die Frage, ob die von uns erzielte Expressionssteigerung für GW501516 durch eine unspezifische Aktivierung anderer PPAR Rezeptoren erreicht wurde, oder ob es sich bei den gefunden KRT20 Werten um zufällige Erhöhungen handelt. Hier lassen sich

aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen keine endgültigen Schlüsse ziehen, jedoch sollten weitere Versuche Klärung bringen.

Lactase

Lactase ist ein weiteres Gen, das bei unseren Microarray Untersuchungen auffällig war. LCT mRNA wird nur in den büstensaumtragenden Enterozyten des Dünndarms exprimiert, wobei das distale Jejunum und das proximale Ileum die höchsten Konzentrationen aufweisen. Die physiologische Funktion der Lactase besteht hauptsächlich in der hydrolytischen Spaltung von Laktose in die beiden Monosaccharide Glucose und Galaktose (71).

Von uns konnte als erste gezeigt werden, dass die Expression von LCT in Caco2 Zellen sowohl durch PPAR γ als auch durch PPAR δ gesteigert werden kann. Allerdings konnten wir bei den differenzierten Zellen auch für den PPAR δ Antagonisten eine annähernd gleichwertig LCT Expression wie für den PPAR δ Aktivator finden. Daher stellt sich für uns die Frage, in wie weit die von uns gezeigte Expressionserhöhung wirklich durch PPAR Agonisten vermittelt wird, beziehungsweise, ob diese Expressionserhöhung durch eine weitere, bisher unbekannte PPAR-sensitive Zwischenstation verschaltet wird.

Sollten weitere Tests jedoch bestätigen, dass Lactase mittels PPAR hochreguliert werden kann und sollte sich dieser Effekt auch auf Proteinebene bestätigen, so kann sich eine Lactoseunverträglichkeit durch Lactasemangel mittels PPAR δ Agonisten zumindest theoretisch vermindern lassen.

ADFP

Das Oberflächenprotein Adipophilin ist ein früher Marker für die Ausdifferenzierung von Adipozyten (72). Über die physiologischen Eigenschaften von ADFP findet sich in der Literatur eine Vielzahl von Hypothesen. So konnte für Fibroblasten, Ito-Zellen und auch THP-1 Makrophagen eine erhöhte Zahl von intrazellulären Lipidtröpfchen und eine erhöhte Lipidspeicherung nachgewiesen werden (73-75), andererseits führten Untersuchungen von *Chang et al.* zu der Erkenntnis, dass eine verminderte ADFP Expression in Knock-out Mäusen eine verminderte Konzentration von Triglyceriden im Zytosol verursacht, jedoch ohne die hepatische Fettsäuresynthese,

die VLDL-Synthese oder β -Oxidation signifikant zu beeinflussen. Vielmehr konnte festgestellt werden, dass es durch die erniedrigte ADFP Expression zu einer Zunahme von Triglyceriden in den Mikrosomen kommt. Die dem normalen Maße entsprechende VLDL-Synthese erklären *Chang et. al* dadurch, dass es durch die verminderte Ausschleusung von Triglyceriden aus dem endoplasmatischen Retikulum dort zu einem Anstieg dieser kommt und damit trotz eines insgesamt erniedrigten Lipidspiegels eine gleich bleibende VLDL-Synthese stattfindet. Dies wiederum führte zu der Hypothese, dass ADFP für den Einbau von Triglyceriden in Lipidtröpfchen im endoplasmatischen Retikulum eine sehr wichtige Rolle spielt (76). Hier konnte sowohl in den Microarray Analysen als auch in den anschließenden TaqMan Assays gezeigt werden, dass sowohl PPAR γ als auch PPAR δ -stimulierende Substanzen eine erhöhte ADFP Expression bewirken. Diese führen daher zu der Annahme, dass eine PPAR δ -Stimulation eine erhöhte Expression von ADFP mit der daraus resultierenden Erhöhung von Triglyceriden im endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat. Die physiologischen Auswirkungen dieser erhöhten Lipidtröpfchensynthese bleiben zunächst ungewiss, jedoch kann hierbei aufgrund der erhöhten Rate der mitochondrialen β -Oxidation eine gesteigerte Bereitstellung von Triglyceriden als Substrat für die Energiegewinnung vermutet werden.

Sollte dies der Fall sein, so kann man durch eine PPAR δ Stimulation eine Erhöhung der Stoffwechselrate und einen daraus folgenden gesteigerten Verbrauch von Fettsäuren erzielen. Dadurch lässt sich wiederum die Speichermenge der Triglyceride senken.

Jedoch steht dies im Gegensatz zu der von *Chang et al.* getroffenen Aussage, dass ADFP -/- Mäuse resistent für die Entwicklung einer Nicht-alkoholischen Fettleber sind und deshalb eine Hemmung der ADFP bei unveränderten Plasmalipidzusammensetzungen einer Fettleber vorbeugen kann.

Man darf hier allerdings nicht außer Betracht lassen, dass *Chang et al.* ihre Versuche an Leberzellen durchführten, wir unsere Erkenntnisse aber an Darmzellen gewonnen haben und darin ein unterschiedlicher Effekt begründet liegen kann.

Des Weiteren stellt sich für ADFP ebenso wie für SLC25A20 die Frage, ob die von uns gefundene gesteigerte Expression direkt durch die PPAR δ -Stimulation oder durch den in der Folge der gesteigerten β -Oxidation aufgetretenen Substratmangel erfolgt. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig, einerseits auf genetischer Ebene, zum Beispiel mittels gezielter Genausschaltung durch siRNA. Hinweise aus der

Literatur lassen jedoch die Vermutung zu, dass die erhöhte Expression von ADFP direkt durch den PPAR δ Aktivator beziehungsweise GW501516 erfolgt (48, 77). Zum anderen sollte auch den weiteren, an der Bildung von Lipidtröpfchen beteiligten Oberflächenproteinen Beachtung geschenkt und eine mögliche Auswirkung der gesteigerten ADFP Expression auf deren Expression untersucht werden.

Die Frage, ob eine gesteigerte β -Oxidation und eine erhöhte Triglyceridausschleusung oder die von *Chang et al.* vorgeschlagene Hemmung der ADFP Expression zu einer für Diabetes und Hypercholesterinämie-Patienten positiven Beeinflussung des Stoffwechsels führt, bedarf deshalb weiterer Versuche.

4.3 Detoxifikation

Im Rahmen der Microarray Untersuchungen wurden mehrere Gene aus dem Bereich der Phase I Detoxifikation untersucht, wobei CYP1A1 (Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1) als einziges Gen eine veränderte Expression aufwies. Hierbei konnte durch den PPAR δ Antagonisten eine deutliche Steigerung der Expression in beiden Zellkulturenansätzen erreicht werden.

CYP1A1 spielt eine Rolle bei der Oxidation von potentiell kanzerogenen Substanzen, zum Beispiel polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (78). Da eine Überexpression von CYP1A1 die Menge kanzerogener Metabolite erhöht und dadurch deren schädliche Einflüsse auf die DNA zunehmen, wird CYP1A1 eine Rolle bei der Tumorentstehung zugeschrieben (79).

In der Literatur finden sich gehäuft Hinweise auf eine PPAR vermittelte CYP1A1 Expressionsänderung, hierbei vor allem durch PPAR α und auch PPAR γ (80, 81).

Die von *Kim et al.* gefundene Erhöhung der CYP1A1 Expression für PPAR γ konnte durch den von uns verwendeten PPAR γ Liganden Rosiglitazone nicht bestätigt werden. Hierbei stellt sich die Frage, ob sich dieser, von Kim et al. für Maushepatozyten nachgewiesene Effekt bei humanen Darmzellen nicht zeigt, oder ob der fehlenden Expressionssteigerung für CYP1A1 andere Ursachen zugrunde liegen.

Bezüglich der von uns gefundenen CYP1A1 Induktion durch den PPAR δ Antagonisten lassen sich in der Literatur keine weiteren Hinweise finden. Um die Ursache für diese Induktion zu klären, werden weitere Versuche benötigt. Allerdings

konnte von uns gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem PPAR δ Aktivator keine erhöhte Expression von CYP1A1 zu Folge hat.

4.4 PPAR δ Einflüsse auf ABC-Transporter

ABCG5, ABCG8

Bei den beiden als *Halfsize* - Transporter vor allem in Leber und Dünndarm vorkommenden ABCG5 und ABCG8 lassen sich in unseren Versuchen bei den Kolonepithelzellen ähnelnden undifferenzierten Zellen eine Erhöhung der Expression für ABCG5 durch GW501516 und für ABCG8 durch Rosiglitazone erkennen.

Bei den differenzierten Caco2-Zellen, die in ihrer Morphologie Dünndarmepithelzellen gleichen, fand sich für ABCG5 eine deutliche Herabsetzung, beziehungsweise eine annähernd totale Suppression der Expression durch die Gabe des PPAR δ Aktivators. Für ABCG8 konnte durch den PPAR δ Aktivator keine Änderung der Expression erreicht werden. Hier fand sich vielmehr eine erhöhte Expression durch Rosiglitazone und vor allem durch den PPAR δ Antagonisten.

Die enge Korrelation der beiden Transporter würde hier aber eine gemeinschaftliche Regulation erwarten lassen. Dies legen auch Versuche nahe, die zeigen, dass weder ABCG5 noch ABCG8 in der Lage sind, ihre Funktion als Monomere auszuüben. Dort wurde an G5/G8 $-/-$ Mäusen gezeigt, dass die alleinige Transfektion mit einem der beiden Transporter die Funktion nicht wieder herstellt, ebenso wenig wie eine Kombination mit anderen ABCG Transportern (31). Die physiologische Funktion von ABCG5 und ABCG8 scheint darin zu bestehen, Cholesterin in die Gallenflüssigkeit abzugeben und zusätzlich in Enterozyten Nahrungssterole, wie Sitosterol und Campesterol in einer Art *Kick-back*-Mechanismus zu eliminieren (32, 82, 83). Allerdings muss man ebenso bedenken, dass Studien zur Lokalisation von ABCG5 und ABCG8 in Zellen ein ähnliches, nicht aber identisches Verteilungsmuster erkennen ließen (84). Daher ist nicht auszuschließen, dass PPAR-Mediatoren einen Einfluss auf bisher unbekannte, homodimere Verbindungen von ABCG5 beziehungsweise ABCG8 Transportern haben.

Hier stellt sich in der Zusammenschau die Frage, ob die Gabe des PPAR δ Aktivators auch bei größer angelegten Analysen und in Studien auf Proteinebenen eine drastische Abnahme der ABCG5 Expression untermauern. Sollte dies der Fall sein,

so stellt die Gabe des PPAR δ Aktivators durchaus ein Risiko für die Verringerung der Sterolelimination in Dünndarm und Gallensekret dar. Allerdings muss man auch bedenken, dass die in Expressionsstudien gefundenen Ergebnisse erst durch weitere Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt werden müssen, um eine definitive Aussage über die physiologischen Veränderungen im Organismus bei Gabe eines PPAR δ Aktivators beziehungsweise der anderen Stimulanzien zu erlauben.

ABCA1, ABCG1

ABCA1 und ABCG1 sind zwei weit verbreitete Mitglieder der ATP-Binding-Cassette-Familie. Man findet sie vor allem in Makrophagen, Hepatozyten, der Nebenniere sowie im Darm. Beide sind in ihrer Expression stark abhängig vom intrazellulären Cholesteringehalt (35).

Frühere Arbeiten zeigen, dass ABCA1 im Bereich des zellulären Lipidtransports und der Lipidausschleusung eine wichtige Rolle spielt, außerdem lässt sich für ABC A1 ein bedeutender Einfluss auf die Gesamt-Lipidhomöostase vermuten. Hierbei stützen sich die Aussagen auf die Ergebnisse der Untersuchungen bei Patienten mit familiären HDL-Defizienz-Erkrankungen, allen voran das Tangier Syndrom (85-87), eine familiär vererbte Erkrankung mit mutiertem ABCA1, sowie auf ABCA1 -/- Knock-out Mäuse. Tangier-Patienten weisen eine Plasma-HDL-Konzentration von annähernd null, sowie geringe Serumcholesterinwerte und einen deutlich reduzierten Cholesterin- und Phospholipidausstrom aus verschiedenen Zellen auf. Die niedrigen HDL-Level beim Tangier Syndrom beruhen hauptsächlich auf einem erhöhten Verbrauch der cholesterinarmen, Phospholipid und apoA-I reichen HDL Vorläuferstufen (88). Bei den ABCA1 -/- Mäusen finden sich ähnlich wie bei Tangier Patienten fehlendes HDL-Cholesterin und apoA-I, sowie ein erniedrigtes Serumgesamtcholesterin und Lipidablagerungen in verschiedenen Geweben(89). Weiterhin legt diese Arbeit nahe, dass ABCA1 als Cotransporter für Cholesterin und Phospholipide wirken könnte. Andererseits finden sich durch Transfektion von ABCA1 in Endothelzellen eine deutliche Steigerung des apoA-I vermittelten Cholesterinausstroms aus den Zellen (90).

In der Literatur finden sich auch Hinweise über einen Einfluss von PPAR auf die Expression von ABCA1 sowie ABCG1 durch die Stimulation der PPAR-Rezeptoren mit Cholesterin.

Ziel der Untersuchungen war es, eine mögliche Auswirkung von PPAR δ -Agonisten auf diese wichtigen Transporter zu identifizieren. Die bei den undifferenzierten Zellen gefundenen Ergebnisse legen eine Verminderung der ABCA1 Expression durch eine PPAR γ Stimulation sowie, in gewissem Maße, auch durch eine Hemmung von PPAR δ nahe, wohingegen bei ABCG1 keine Änderung zu erkennen ist. Bei den in ihrer Morphologie und Funktion den Dünndarmepithelien entsprechenden, ausdifferenzierten Caco2-Zellen hingegen, zeigen sich für ABCA1 keine Expressionsänderungen, während es bei ABCG1 zu einer deutlichen Hochregulierung der ABCG1 Expression durch den PPAR δ Antagonisten kommt. Die Ergebnisse für ABCA1 widersprechen den Ergebnissen von *Oliver et al.* (16), die eine ca. 2-fache Steigerung der ABCA1 Expression in humanen Darmzellen bei Gabe von GW501516 feststellen konnten. Hierbei muss man jedoch hinzufügen, dass *Oliver et al.* für ihre Versuche eine andere Darmzellreihe (FHS74) verwendeten und die deutlichsten Ergebnisse bei humanen THP1 Makrophagen zu finden waren. Dies könnten mögliche Ursachen für den Unterschied in den Ergebnissen darstellen. Generell ist der Vergleich von Ergebnissen aus Caco2 Versuchen schwierig, da ein Großteil der bisherigen Forschung zur Änderungen der ABCA1 und ABCG1 Expression an Makrophagen durchgeführt wurde und bisher in der Literatur keine Versuche mit Caco2 Zellen zu finden sind. Die Änderung der ABCG1 Expression durch den PPAR δ Antagonist stellt eine interessante Entdeckung dar, da ähnliche Versuche von *Li et al.* mit Makrophagen eine Erhöhung der ABCG1 Aktivierung durch eine Stimulation durch PPAR γ erzielten, wir dies jedoch nicht nachweisen konnten. Allerdings wurden von *Li et al.* keine PPAR δ Antagonisten untersucht, somit sind hier auch keine Vergleichswerte zu erhalten(91). Dabei stellt sich die Frage, ob und in welchem Maße dies einen Einfluss auf eine mögliche Arzneimitteltherapie mittels PPAR δ hätte. Darüber hinaus gelten unsere Ergebnisse nur auf mRNA Ebene und erlauben noch keine Aussage über eine mögliche Veränderung der ABCA1 und ABCG1 Funktion auf Proteinebene. Hierzu müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

ABCC4, ABCG2

Eine weitere Gruppe der von uns untersuchten ABC-Transporter waren ABCC4 und ABCG2, die maßgeblich an der Multi-Drug-Resistance beteiligt sind. In diesem Fall war es wichtig, zu klären ob eine Behandlung mittels PPAR δ Aktivator einen negativen Effekt auf diese, vor allem bei der medikamentösen Therapie von Zweiterkrankungen, wichtigen Transporter hat. ABCG2, das sogenannte Breast Cancer Resistance Protein, wird beim Mamma Karzinom in verstärktem Maße exprimiert, genauso wie in anderen soliden Tumoren, zum Beispiel Magen-, hepatozellulären und Kolonkarzinomen sowie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und in Melanomen (92). Besonders problematisch ist hierbei die Tatsache, dass gängige Chemotherapeutika wie Anthracycline, Doxorubicin, Irinotecan oder Mitoxantron Substrate für ABCG2 darstellen und somit vor Wirkbeginn in den Tumorzellen wieder ausgeschleust werden (36). Hierbei zeigt sich, dass sich durch den PPAR δ Aktivator keine Veränderung der ABCC4 Expression ergibt, es findet sich jedoch bei ABCG2 eine erhöhte Expression bei Gabe des PPAR γ Agonisten Rosiglitazone. Diese Daten decken sich mit denen einer Studie von *Szatmari et al.*, die bei humanen dendritischen Zellen ebenfalls eine ABCG2 Expressionserhöhung durch Gabe des PPAR γ Agonisten Rosiglitazone erzielen konnten (49).

Die Ergebnisse zeigen hier zum einen, dass bei einer Therapie mit dem PPAR δ Aktivator kein erhöhtes Risiko für ein Nichtansprechen einer Chemotherapie besteht, zum anderen aber, dass eine Therapie mit Rosiglitazone bei Tumorerkrankungen möglicherweise den Effekt der anti-tumorösen Therapie gefährden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wichtig, die Effekte von Glitazonen im Allgemeinen und Rosiglitazone im Speziellen auf die ABCG2 Expression weiter zu untersuchen.

4.5 PPAR

Um eine mögliche Beeinflussung unserer Ergebnisse durch eine direkte Induktion von PPAR auszuschließen, wurde von uns die mRNA Konzentration der untersuchten PPAR γ und PPAR δ , sowie dem ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor RXR β analysiert.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass es durch keinen der verwendeten Reaktionsansätze zu einer Induktion der PPAR γ oder PPAR δ Genexpression kommt.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Erwartungen, da eine Expressionserhöhung durch Gabe der Stimulanzen einen alternativen Aktivierungsweg vermuten ließe. Die fehlende Erhöhung der PPAR und RXR Expression jedoch zeigt, dass die von uns erzielten Expressionsänderungen durch eine PPAR Aktivierung und nicht durch weiter oben in der Signalkaskade sitzende Rezeptoren vermittelt werden.

4.6 Entzündungsmediatoren

Im Bereich der von uns untersuchten Entzündungsmediatoren Interleukin 1 β , Interleukin 8 und Tumornekrosefaktor α konnten wir zeigen, dass keine der Substanzen eine signifikante Veränderung der jeweiligen Genexpression hervorruft. Diese Ergebnisse unserer TaqMan Assays konnten wir durch die mit dem Zellkulturüberstand durchgeführten ELISA Analysen validieren und somit zeigen, dass weder auf genetischer, noch auf zellulärer Ebene eine gesteigerte Produktion von IL1 β , IL8 oder TNF α stattfindet. Unsere Ergebnisse decken sich dabei mit mehreren anderen Publikationen, die ebenfalls für die von uns untersuchten Entzündungsmediatoren keine erhöhte Expression, beziehungsweise sogar eine Expressionsverminderung durch PPAR Agonisten erzielen konnten (93, 94). So konnten *Li et al.* zeigen, dass es bei der Gabe eines PPAR δ Agonisten (GW0742) in Makrophagen arteriosklerotischer Herde bei Mäusen für Interleukin 1 β sowie TNF α zu einer signifikanten Verminderung der jeweiligen Expression kommt (91). In einer kürzlich veröffentlichten Publikation von *Piqueras et al.* kann auch gezeigt werden, dass GW501516 eine deutliche Reduktion der durch TNF α Stimulation ausgelösten Entzündungsreaktion erreichen kann, jedoch blieb die IL-8 Ausschüttung davon unbeeinträchtigt(95). *Haskova et al.* zeigen in einem anderen Aufbau ebenfalls eine durch einen PPAR δ Agonisten (GW0742) verminderte Expression von IL1 β sowie TNF α bei Lipopolysaccharid-induzierter pulmonaler Entzündung (96).

Betrachtet man all diese Ergebnisse, so kann gesagt werden, dass der PPAR δ Aktivator möglicherweise einen interessanten Therapieansatz bei der Bekämpfung von Entzündungsreaktionen im Körper bietet.

4.7 Weitere differentiell exprimierte Gene

Im Rahmen der ELISA Assays fiel bei den undifferenzierten Caco2-Zellen die deutliche Steigerung der Expression für SOX18 (Sex-Determining-Region Y, Box 18) bei Rosiglitazone, GW501516 und dem PPAR δ Aktivator auf. In geringerem Maße fanden sich diese Expressionserhöhungen auch bei den differenzierten Zellen, jedoch ließen sich diese Ergebnisse bei den TaqMan Untersuchungen in keinem der Fälle wiederholen. Die Ursache hierfür bleibt rätselhaft, jedoch ist hierbei von einem zufälligen Auftreten auszugehen, da bei keiner der mittels TaqMan untersuchten Zellreihen eine Expression von SOX18 festgestellt werden konnte. Weiterhin finden sich auch in der Literatur keine Hinweise auf eine Beeinflussung der SOX18 Expression durch Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors.

4.8 Zusammenfassung

Die hier mittels Affimetrix Microarray, TaqMan und ELISA Analysen durchgeführten Versuche über die Auswirkung von PPAR δ Agonisten auf humane Darmzellen führten zu einer Vielzahl interessanter Ergebnisse.

Bei der mitochondrialen Energiegewinnung kommt es durch den PPAR δ Aktivator zu einer deutlichen Steigerung der Expression von Genen, deren Proteine eine wichtige Rolle bei der Synthese von Ketonkörpern spielen. Hier konnten wir zeigen, dass sich sowohl die beiden an der mitochondrialen β -Oxidation beteiligten Gene CPT1A und SLC25A20, sowie HMGCS2 durch den PPAR δ Aktivator in ihrer Expression deutlich steigern lassen. Können diese Ergebnisse auf Proteinbasis reproduziert werden, muss dann aus physiologischer Sicht geklärt werden, in wie weit die Ketonkörperproduktion die Gefahr einer metabolischen Entgleisung mit sich bringen kann. Sollte sich dabei zeigen, dass die Gefahr einer übermäßigen Produktion von Ketonkörpern gegeben ist, dann würde sich für den PPAR δ Aktivator ein ähnliches Risikoprofil wie für das bekannte Biguanid Metformin ergeben.

In diesem Zusammenhang ebenfalls interessant ist die gesteigerte Expression von Adipophilin. Hier vermuten wir, dass damit einem möglichen Substratmangel für die β -Oxidation entgegengesteuert wird.

Generell konnte gezeigt werden, dass PPAR δ eine entscheidende Rolle in der Stimulation von Stoffwechselvorgängen und der körpereigenen Energiehomöostase besitzt und daher potentiell als Kontrollmedium der anabolen Stoffwechselvorgänge in Frage kommt.

Für ABCG5 konnte gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Expressionsverminderung durch den PPAR δ Aktivator kommt, wohingegen der vermutlich als Heterodimer eng verknüpfte ABCG8 Transporter keine Änderung der Expression aufwies. Hier stellt sich die Frage, in wie weit die beiden Transporter wirklich von einander abhängig sind, und ob es nicht zumindest in bestimmten Zellen eine andere Verteilung gibt als bisher vermutet.

Weiterhin konnten wir für die im Bereich der Multi-Drug-Resistance lokalisierten Transporter ABCC4 und ABCG2 zeigen, dass PPAR δ Stimulation nicht zu einer erhöhten Expression führt, und sich somit auch kein negativer Einfluss auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika bei gleichzeitiger PPAR δ Gabe zeigt.

Die untersuchten Entzündungsmediatoren IL1 β , IL8 und TNF α wiesen allesamt keine gesteigerte Expression bei Gabe des PPAR δ Aktivators auf, ebenso wenig die mittels Zellkulturüberstand durchgeführten ELISA Untersuchungen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Autoren und legen nahe, dass PPAR δ keine gesteigerte Entzündungsreaktion hervorruft.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich PPAR δ als interessanter Regulator für verschiedene Stoffwechselvorgänge herausgestellt hat, und eine Therapie mittels PPAR δ Aktivator ein mögliches Behandlungsregime der Zukunft darstellen kann. Allerdings muss auch angemerkt werden, dass alle hier auf mRNA Ebene gefundenen Ergebnisse erst durch Nachweis auf Proteinebene validiert werden müssen. Auch sollten weitere Untersuchungen über die Wirkung einer dauerhaften Stimulation des Rezeptors durchgeführt werden, um mögliche positive, vor allem aber negative, bisher nicht vorhersehbare Effekte nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen. Hier können zukünftige Studien noch eine Vielzahl neuer Einblicke gewähren.

5 Literaturverzeichnis

1. Barrett, K. E. Gastrointestinal Physiology. In Mc Graw Hill, Ed.; , 2006.
2. *Taschenatlas der Physiologie* Silbernagl S., Despopoulus A., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2003.
3. Michalik, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors and cancers: complex stories. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, *4*, 61-70.
4. Burdick, A. D.; Kim, D. J.; Peraza, M. A.; Gonzalez, F. J.; Peters, J. M. The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation. *Cell. Signal*. **2006**, *18*, 9-20.
5. Yki-Jarvinen, H. Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med*. **2004**, *351*, 1106-1118.
6. Nolan, J. J.; Ludvik, B.; Beerdson, P.; Joyce, M.; Olefsky, J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N. Engl. J. Med*. **1994**, *331*, 1188-1193.
7. Suter, S. L.; Nolan, J. J.; Wallace, P.; Gumbiner, B.; Olefsky, J. M. Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* **1992**, *15*, 193-203.
8. Miyazaki, Y.; Glass, L.; Triplitt, C.; Matsuda, M.; Cusi, K.; Mahankali, A.; Mahankali, S.; Mandarino, L. J.; DeFronzo, R. A. Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients. *Diabetologia* **2001**, *44*, 2210-2219.
9. Bajaj, M.; Suraamornkul, S.; Piper, P.; Hardies, L. J.; Glass, L.; Cersosimo, E.; Pratipanawatr, T.; Miyazaki, Y.; DeFronzo, R. A. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2004**, *89*, 200-206.
10. Sarraf, P.; Mueller, E.; Jones, D.; King, F. J.; DeAngelo, D. J.; Partridge, J. B.; Holden, S. A.; Chen, L. B.; Singer, S.; Fletcher, C.; Spiegelman, B. M. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med*. **1998**, *4*, 1046-1052.
11. Tanaka, T.; Kohno, H.; Yoshitani, S.; Takashima, S.; Okumura, A.; Murakami, A.; Hosokawa, M. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*. **2001**, *61*, 2424-2428.
12. Osawa, E.; Nakajima, A.; Wada, K.; Ishimine, S.; Fujisawa, N.; Kawamori, T.; Matsubashi, N.; Kadowaki, T.; Ochiai, M.; Sekihara, H.; Nakagama, H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 361-367.
13. Peters, J. M.; Lee, S. S.; Li, W.; Ward, J. M.; Gavrilova, O.; Everett, C.; Reitman, M. L.; Hudson, L. D.; Gonzalez, F. J. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol. Cell. Biol*. **2000**, *20*, 5119-5128.
14. Amri, E. Z.; Bonino, F.; Ailhaud, G.; Abumrad, N. A.; Grimaldi, P. A. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem*. **1995**, *270*, 2367-2371.

15. Hertz, R.; Berman, I.; Keppler, D.; Bar-Tana, J. Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR). *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 242-247.
16. Oliver, W. R., Jr; Shenk, J. L.; Snaith, M. R.; Russell, C. S.; Plunket, K. D.; Bodkin, N. L.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Sznaidman, M. L.; Lambert, M. H.; Xu, H. E.; Sternbach, D. D.; Kliwer, S. A.; Hansen, B. C.; Willson, T. M. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5306-5311.
17. Poirier, H.; Niot, I.; Monnot, M. C.; Braissant, O.; Meunier-Durmort, C.; Costet, P.; Pineau, T.; Wahli, W.; Willson, T. M.; Besnard, P. Differential involvement of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors alpha and delta in fibrates and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 481-488.
18. Fredenrich, A.; Grimaldi, P. A. PPAR delta: an uncompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab.* **2005**, *31*, 23-27.
19. He, T. C.; Chan, T. A.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **1999**, *99*, 335-345.
20. Park, B. H.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2598-2603.
21. Gupta, R. A.; Tan, J.; Krause, W. F.; Geraci, M. W.; Willson, T. M.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 13275-13280.
22. Gupta, R. A.; Wang, D.; Katkuri, S.; Wang, H.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 245-247.
23. Reed, K. R.; Sansom, O. J.; Hayes, A. J.; Gescher, A. J.; Winton, D. J.; Peters, J. M.; Clarke, A. R. PPARdelta status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* **2004**, *23*, 8992-8996.
24. Harman, F. S.; Nicol, C. J.; Marin, H. E.; Ward, J. M.; Gonzalez, F. J.; Peters, J. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 481-483.
25. Chantret, I.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brattain, M. G.; Zweibaum, A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 1936-1942.
26. Engle, M. J.; Goetz, G. S.; Alpers, D. H. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J. Cell. Physiol.* **1998**, *174*, 362-369.
27. Meunier, V.; Bourrie, M.; Berger, Y.; Fabre, G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **1995**, *11*, 187-194.
28. Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.

29. FORSTER, *ZWISCHENMOLEKULARE ENERGIEWANDERUNG UND FLUORESZENZ. *Annalen der Physik* **1948**, 2, 55.
30. Camarero, N.; Mascaró, C.; Mayordomo, C.; Vilardell, F.; Haro, D.; Marrero, P. F. Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Mol. Cancer. Res.* **2006**, 4, 645-653.
31. Graf, G. A.; Yu, L.; Li, W. P.; Gerard, R.; Tuma, P. L.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48275-48282.
32. Berge, K. E.; Tian, H.; Graf, G. A.; Yu, L.; Grishin, N. V.; Schultz, J.; Kwiterovich, P.; Shan, B.; Barnes, R.; Hobbs, H. H. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **2000**, 290, 1771-1775.
33. Langmann, T.; Klucken, J.; Reil, M.; Liebisch, G.; Luciani, M. F.; Chimini, G.; Kaminski, W. E.; Schmitz, G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 257, 29-33.
34. Drobnik, W.; Lindenthal, B.; Lieser, B.; Ritter, M.; Christiansen Weber, T.; Liebisch, G.; Giesa, U.; Igel, M.; Borsukova, H.; Buchler, C.; Fung-Leung, W. P.; Von Bergmann, K.; Schmitz, G. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology* **2001**, 120, 1203-1211.
35. Klucken, J.; Buchler, C.; Orso, E.; Kaminski, W. E.; Porsch-Ozcurumez, M.; Liebisch, G.; Kapinsky, M.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Dean, M.; Allikmets, R.; Schmitz, G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 817-822.
36. Mao, Q.; Unadkat, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* **2005**, 7, E118-33.
37. Rubie, C.; Frick, V. O.; Pfeil, S.; Wagner, M.; Kollmar, O.; Kopp, B.; Graber, S.; Rau, B. M.; Schilling, M. K. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2007**, 13, 4996-5002.
38. McGarry, J. D.; Mannaerts, G. P.; Foster, D. W. Characteristics of fatty acid oxidation in rat liver homogenates and the inhibitory effect of malonyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 530, 305-313.
39. McGarry, J. D.; Woeltje, K. F.; Kuwajima, M.; Foster, D. W. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab. Rev.* **1989**, 5, 271-284.
40. Chen, S.; Ogawa, A.; Ohneda, M.; Unger, R. H.; Foster, D. W.; McGarry, J. D. More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* **1994**, 43, 878-883.
41. Newgard, C. B.; McGarry, J. D. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 689-719.
42. Stein, D. T.; Esser, V.; Stevenson, B. E.; Lane, K. E.; Whiteside, J. H.; Daniels, M. B.; Chen, S.; McGarry, J. D. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J. Clin. Invest.* **1996**, 97, 2728-2735.

43. Chatelain, F.; Kohl, C.; Esser, V.; McGarry, J. D.; Girard, J.; Pegorier, J. P. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 789-798.
44. Ellinghaus, P.; Wolfrum, C.; Assmann, G.; Spener, F.; Seedorf, U. Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/ sterol carrier protein x-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2766-2772.
45. Kaikaus, R. M.; Chan, W. K.; Ortiz de Montellano, P. R.; Bass, N. M. Mechanisms of regulation of liver fatty acid-binding protein. *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, *123*, 93-100.
46. Wolfrum, C.; Ellinghaus, P.; Fobker, M.; Seedorf, U.; Assmann, G.; Borchers, T.; Spener, F. Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 708-714.
47. Wolfrum, C.; Borrmann, C. M.; Borchers, T.; Spener, F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2323-2328.
48. Gupta, R. A.; Brockman, J. A.; Sarraf, P.; Willson, T. M.; DuBois, R. N. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29681-29687.
49. Szatmari, I.; Vamosi, G.; Brazda, P.; Balint, B. L.; Benko, S.; Szeles, L.; Jeney, V.; Ozvegy-Laczka, C.; Szanto, A.; Barta, E.; Balla, J.; Sarkadi, B.; Nagy, L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23812-23823.
50. Spiegelman, B. M.; Puigserver, P.; Wu, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2000**, *24 Suppl 4*, S8-10.
51. Martinelli, N.; Girelli, D.; Malerba, G.; Guarini, P.; Illig, T.; Trabetti, E.; Sandri, M.; Friso, S.; Pizzolo, F.; Schaeffer, L.; Heinrich, J.; Pignatti, P. F.; Corrocher, R.; Olivieri, O. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 941-949.
52. Das, U. N. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor in the initiation and progression of atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2007**, *76*, 251-268.
53. Enoch, H. G.; Catala, A.; Strittmatter, P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 5095-5103.
54. Yao-Borengasser, A.; Rassouli, N.; Varma, V.; Bodles, A. M.; Rasouli, N.; Unal, R.; Phanavanh, B.; Ranganathan, G.; McGehee, R. E., Jr; Kern, P. A. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 4431-4439.
55. Song, J.; Liu, H.; Ransom, H. W.; Tiwari, S.; Ecelbarger, C. M. Chronic rosiglitazone therapy normalizes expression of ACE1, SCD1 and other genes in the

kidney of obese Zucker rats as determined by microarray analysis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2008**, *116*, 315-325.

56. Mar-Heyming, R.; Miyazaki, M.; Weissglas-Volkov, D.; Kolaitis, N. A.; Sadaat, N.; Plaisier, C.; Pajukanta, P.; Cantor, R. M.; de Bruin, T. W.; Ntambi, J. M.; Lusis, A. J. Association of stearoyl-CoA desaturase 1 activity with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1193-1199.

57. Kim, Y. C.; Gomez, F. E.; Fox, B. G.; Ntambi, J. M. Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1310-1316.

58. Kurebayashi, S.; Hirose, T.; Miyashita, Y.; Kasayama, S.; Kishimoto, T. Thiazolidinediones downregulate stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **1997**, *46*, 2115-2118.

59. Riserus, U.; Tan, G. D.; Fielding, B. A.; Neville, M. J.; Currie, J.; Savage, D. B.; Chatterjee, V. K.; Frayn, K. N.; O'Rahilly, S.; Karpe, F. Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* **2005**, *54*, 1379-1384.

60. Robinson, A. M.; Williamson, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **1980**, *60*, 143-187.

61. Hsu, M. H.; Savas, U.; Griffin, K. J.; Johnson, E. F. Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27950-27958.

62. O'Brien, R. M.; Lucas, P. C.; Forest, C. D.; Magnuson, M. A.; Granner, D. K. Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science* **1990**, *249*, 533-537.

63. Reshef, L.; Hanson, R. W.; Ballard, F. J. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 5979-5984.

64. Raz, I.; Eldor, R.; Cernea, S.; Shafrir, E. Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2005**, *21*, 3-14.

65. Glorian, M.; Duplus, E.; Beale, E. G.; Scott, D. K.; Granner, D. K.; Forest, C. A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* **2001**, *83*, 933-943.

66. Franckhauser, S.; Munoz, S.; Pujol, A.; Casellas, A.; Riu, E.; Otaegui, P.; Su, B.; Bosch, F. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* **2002**, *51*, 624-630.

67. Souza, S. C.; Yamamoto, M. T.; Franciosa, M. D.; Lien, P.; Greenberg, A. S. BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor-alpha: a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* **1998**, *47*, 691-695.

68. Calnek, D.; Quaroni, A. Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation. *Differentiation* **1993**, *53*, 95-104.

69. Miettinen, M. Keratin 20: immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas. *Mod. Pathol.* **1995**, *8*, 384-388.

70. Gupta, R. A.; Sarraf, P.; Brockman, J. A.; Shappell, S. B.; Raftery, L. A.; Willson, T. M.; DuBois, R. N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7431-7438.
71. Troelsen, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1723*, 19-32.
72. Jiang, H. P.; Serrero, G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 7856-7860.
73. Imamura, M.; Inoguchi, T.; Ikuyama, S.; Taniguchi, S.; Kobayashi, K.; Nakashima, N.; Nawata, H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *283*, E775-83.
74. Fukushima, M.; Enjoji, M.; Kohjima, M.; Sugimoto, R.; Ohta, S.; Kotoh, K.; Kuniyoshi, M.; Kobayashi, K.; Imamura, M.; Inoguchi, T.; Nakamura, M.; Nawata, H. Adipose differentiation related protein induces lipid accumulation and lipid droplet formation in hepatic stellate cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2005**, *41*, 321-324.
75. Larigauderie, G.; Furman, C.; Jaye, M.; Lasselin, C.; Copin, C.; Fruchart, J. C.; Castro, G.; Rouis, M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 504-510.
76. Chang, B. H.; Li, L.; Paul, A.; Taniguchi, S.; Nannegari, V.; Heird, W. C.; Chan, L. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1063-1076.
77. Targett-Adams, P.; McElwee, M. J.; Ehrenborg, E.; Gustafsson, M. C.; Palmer, C. N.; McLauchlan, J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1728*, 95-104.
78. Wrighton, S. A.; Stevens, J. C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* **1992**, *22*, 1-21.
79. Schwarz, D.; Kisselev, P.; Cascorbi, I.; Schunck, W. H.; Roots, I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 453-459.
80. Seree, E.; Villard, P. H.; Pascussi, J. M.; Pineau, T.; Maurel, P.; Nguyen, Q. B.; Fallon, F.; Martin, P. M.; Champion, S.; Lacarelle, B.; Savouret, J. F.; Barra, Y. Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 1436-1445.
81. Kim, H. G.; Han, E. H.; Jeong, H. G. Effect of troglitazone on CYP1A1 induction. *Toxicology* **2008**, *246*, 166-171.
82. Schmitz, G.; Langmann, T.; Heimerl, S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1513-1520.
83. Patel, S. B.; Salen, G.; Hidaka, H.; Kwiterovich, P. O.; Stalenhoef, A. F.; Miettinen, T. A.; Grundy, S. M.; Lee, M. H.; Rubenstein, J. S.; Polymeropoulos, M. H.; Brownstein, M. J. Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 1041-1044.

84. Klett, E. L.; Lee, M. H.; Adams, D. B.; Chavin, K. D.; Patel, S. B. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol.* **2004**, *4*, 21.
85. Bodzioch, M.; Orso, E.; Klucken, J.; Langmann, T.; Bottcher, A.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Barlage, S.; Buchler, C.; Porsch-Ozcurumez, M.; Kaminski, W. E.; Hahmann, H. W.; Oette, K.; Rothe, G.; Aslanidis, C.; Lackner, K. J.; Schmitz, G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 347-351.
86. Brooks-Wilson, A.; Marcil, M.; Clee, S. M.; Zhang, L. H.; Roomp, K.; van Dam, M.; Yu, L.; Brewer, C.; Collins, J. A.; Molhuizen, H. O.; Loubser, O.; Ouelette, B. F.; Fichter, K.; Ashbourne-Excoffon, K. J.; Sensen, C. W.; Scherer, S.; Mott, S.; Denis, M.; Martindale, D.; Frohlich, J.; Morgan, K.; Koop, B.; Pimstone, S.; Kastelein, J. J.; Genest, J., Jr; Hayden, M. R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 336-345.
87. Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H.; Real, J.; Amoura, Z.; Piette, J. C.; Deleuze, J. F.; Brewer, H. B.; Duverger, N.; Deneffe, P.; Assmann, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 352-355.
88. Bojanovski, D.; Gregg, R. E.; Zech, L. A.; Meng, M. S.; Bishop, C.; Ronan, R.; Brewer, H. B., Jr In vivo metabolism of proapolipoprotein A-I in Tangier disease. *J. Clin. Invest.* **1987**, *80*, 1742-1747.
89. Orso, E.; Broccardo, C.; Kaminski, W. E.; Bottcher, A.; Liebisch, G.; Drobnik, W.; Gotz, A.; Chambenoit, O.; Diederich, W.; Langmann, T.; Spruss, T.; Luciani, M. F.; Rothe, G.; Lackner, K. J.; Chimini, G.; Schmitz, G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 192-196.
90. Liao, H.; Langmann, T.; Schmitz, G.; Zhu, Y. Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 127-132.
91. Li, A. C.; Binder, C. J.; Gutierrez, A.; Brown, K. K.; Plotkin, C. R.; Pattison, J. W.; Valledor, A. F.; Davis, R. A.; Willson, T. M.; Witztum, J. L.; Palinski, W.; Glass, C. K. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1564-1576.
92. Diestra, J. E.; Scheffer, G. L.; Catala, I.; Maliepaard, M.; Schellens, J. H.; Scheper, R. J.; Germa-Lluch, J. R.; Izquierdo, M. A. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J. Pathol.* **2002**, *198*, 213-219.
93. Jiang, C.; Ting, A. T.; Seed, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **1998**, *391*, 82-86.
94. Marx, N.; Kehrl, B.; Kohlhammer, K.; Grub, M.; Koenig, W.; Hombach, V.; Libby, P.; Plutzky, J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 703-710.
95. Piqueras, L.; Sanz, M. J.; Perretti, M.; Morcillo, E.; Norling, L.; Mitchell, J. A.; Li, Y.; Bishop-Bailey, D. Activation of PPAR β/δ inhibits leukocyte recruitment, cell

adhesion molecule expression, and chemokine release. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, 86, 115-122.

96. Haskova, Z.; Hoang, B.; Luo, G.; Morgan, L. A.; Billin, A. N.; Barone, F. C.; Shearer, B. G.; Barton, M. E.; Kilgore, K. S. Modulation of LPS-induced pulmonary neutrophil infiltration and cytokine production by the selective PPARbeta/delta ligand GW0742. *Inflamm. Res.* **2008**, 57, 314-321.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am	29.04.1983
in	Landau a.d. Isar/Bayern
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1989-1993	Grundschule Pilsting
1993-2002	Gymnasium Landau a.d. Isar

Studium

2002-2004	Vorklinischer Studienabschnitt an der Naturwissenschaftlichen Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg
2004-2009	Klinischer Studienabschnitt am Klinikum der Universität Regensburg
10/2006-04/2007	Forschungsstipendium University of California, San Diego Fr. Prof. Kim E. Barrett

Berufstätigkeit

seit August 2009	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Regensburg
------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

Wissenschaftliche Publikationen

- Chappell AE, Bunz M, Smoll E, Dong H, Lytle C, Barrett KE, McCole DF
Hydrogen peroxide inhibits Ca²⁺-dependent chloride secretion across colonic epithelial cells via distinct kinase signaling pathways and ion transport proteins. FASEB J. 2008 Jun;22(6):2023-36
- McCole DF, Truong A, Bunz M, Barrett KE
Consequences of direct versus indirect activation of epidermal growth factor receptor in intestinal epithelial cells are dictated by protein-tyrosine phosphatase 1B. J Biol Chem. 2007 May 4;282(18):13303-15

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer, PD Dr. Thomas Langmann. Durch seine Anleitung, Motivation und ständige Diskussionsbereitschaft auch nach Dienstschluss hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerd Schmitz danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Arbeit an seinem Lehrstuhl zu erstellen und die Kapazitäten seines Instituts zu nutzen.

Danke auch an Dr. Christoph Möhle, Bettina Hartl, Manfred Haas, Wolfgang Hauer und Harry Isslinger.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei den zahlreichen, nicht namentlich erwähnten, Institutsmitarbeiterinnen und -mitarbeitern bedanken. Sie waren stets hilfsbereit, wenn es um die Lösung von Fragen und Problemen ging.

Mein ganz herzlicher Dank gilt jedoch meiner Familie und Anja. Nur ihre Unterstützung und Liebe haben es mir ermöglicht, diese Arbeit zu einem guten Abschluss zu führen.